

Feinkartierung und Kandidatengenanalyse des Weaver-Syndroms im Braunvieh

von Elisabeth Maria Kunz

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Feinkartierung und Kandidatengenanalyse des Weaver-
Syndroms im Braunvieh**

von
Elisabeth Maria Kunz
aus Kaufbeuren

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Ivica Međugorac

Mitbetreuung durch Dr. Sophie Rothhammer

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Ivica Međugorac

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Meiner Familie, vor allem meinem Ururopa, der diesen Weg vor über einem
Jahrhundert auch eingeschlagen hatte.

| | |
|--|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | VI |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS/TABELLENVERZEICHNIS | X |
| ANHANGSÜBERSICHT | XII |
| | |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 2 LITERATURÜBERSICHT | 3 |
| | |
| 2.1 Rassegeschichte Braunvieh | 3 |
| 2.1.1 Charakteristika | 3 |
| 2.1.2 Anfänge der Rasse Braunvieh | 5 |
| 2.1.3 Brown Swiss | 5 |
| 2.1.4 Deutsches Braunvieh (Braunvieh x Brown Swiss) | 6 |
| 2.1.5 Original Braunvieh | 8 |
| | |
| 2.2 Kartierung von Genen | 10 |
| 2.2.1 Einteilung kartierter Merkmale | 10 |
| 2.2.2 Genetische Marker | 10 |
| 2.2.2.1 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen | 11 |
| 2.2.2.2 Mikrosatelliten | 12 |
| 2.2.2.3 Einzelbasenpolymorphismen | 13 |
| 2.2.3 Genkarten | 15 |
| 2.2.3.1 Kopplung (<i>Linkage</i>) | 15 |
| 2.2.3.1.1 Kopplungsgleichgewicht und Kopplungsungleichgewicht | 16 |
| 2.2.3.2 Kopplungskartierungen (<i>linkage mapping</i>) | 17 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.2.3.3 | Kopplungsungleichgewichts-Kartierungen (<i>linkage disequilibrium mapping</i>)..... | 18 |
| 2.2.3.4 | Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungs- Kartierungen (<i>linkage disequilibrium and linkage mapping</i>)..... | 19 |
| 2.3 | Das Weaver-Syndrom | 21 |
| 2.3.1 | Geschichte | 21 |
| 2.3.2 | Symptome..... | 22 |
| 2.3.2.1 | Frühstadium | 23 |
| 2.3.2.2 | Fortgeschrittenes Stadium | 23 |
| 2.3.2.3 | Endstadium | 25 |
| 2.3.3 | Pathologie | 26 |
| 2.3.3.1 | Pathologisch-anatomische Untersuchung..... | 26 |
| 2.3.3.2 | Pathologisch-histologische Untersuchung | 26 |
| 2.3.4 | Diagnose..... | 27 |
| 2.3.5 | Frequenz in der Braunvieh-/Brown Swiss-Population | 28 |
| 2.3.6 | Bisher durchgeführte Studien..... | 30 |
| 2.3.6.1 | Hoeschele und Meinert: Kopplung mit QTL für Milchmenge..... | 30 |
| 2.3.6.2 | Georges et al.: Kopplung des Weaver-Locus mit TGLA116 | 30 |
| 2.3.6.3 | Erweiterung des indirekten Gentests und Einengung des Weaver-Locus | 31 |
| 2.3.6.4 | McClure et al.: weitere Einengung des Weaver-Locus, diagnostische SNPs und Weaver-Haplotyp | 31 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 33 |
| 3.1 | Material..... | 33 |
| 3.1.1 | Zusammenstellung der Testpopulation | 33 |
| 3.1.2 | Zuteilung der Phänotypen..... | 33 |
| 3.1.3 | Probenmaterial..... | 35 |
| 3.1.4 | Datenmaterial..... | 35 |
| 3.2 | Methoden..... | 36 |
| 3.2.1 | Verwendete Software..... | 36 |
| 3.2.2 | Verwendete Datenbanken | 36 |
| 3.2.3 | Kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungs-Kartierung | 37 |
| 3.2.3.1 | Genotypisierung | 37 |
| 3.2.3.1.1 | Auswahl der zu genotypisierenden Tiere | 37 |
| 3.2.3.1.2 | Durchführung der Genotypisierung | 38 |
| 3.2.3.1.3 | Qualitätskontrolle..... | 40 |
| 3.2.3.2 | Haplotypisierung und Imputation..... | 40 |
| 3.2.3.3 | Korrektur auf Populationsstratifikation und Verwandtschaftsbeziehungen | 42 |
| 3.2.3.4 | Hauptkomponentenanalyse..... | 43 |
| 3.2.3.5 | Bestimmung der Locus IBD und Diplotypen- Verwandtschaftsmatrix..... | 44 |
| 3.2.3.6 | Varianzkomponentenanalyse | 45 |
| 3.2.3.7 | Likelihood-Ratio Teststatistik..... | 47 |
| 3.2.3.8 | Festlegung der Signifikanzschwelle | 47 |
| 3.2.3.9 | Bestimmung der Konfidenzintervalle | 48 |
| 3.2.4 | Vergleichende Kartierung per Fall-Kontroll- Assoziationsanalyse | 48 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2.5 | Ermittlung eines Weaver-Haplotypen auf BTA4..... | 49 |
| 3.2.6 | Nutzung von Sequenzdaten aus dem <i>1000 Bull Genomes Project</i> | 49 |
| 3.2.7 | Überprüfung von Kandidatenmutationen durch gezielte Genotypisierungen | 50 |
| 3.2.7.1 | Gezielte Genotypisierungen des SNP an Position 49 878 773 bp | 50 |
| 3.2.7.2 | Gezielte Genotypisierungen des SNP an Position 50 858 538 bp | 52 |
| 3.2.7.3 | Überprüfung des Krankheitsstatus von Tieren mit abweichenden PCR-RFLP Genotypen..... | 53 |
| 3.2.8 | Schätzung der Frequenz der Kandidatenmutation an Position 49 878 773 bp in einer Stichprobe von Braunvieh-Tieren aus der genomischen Evaluation..... | 54 |
| 3.2.9 | Schätzung der Frequenz des Weaver-Haplotypen in anderen Rassen..... | 54 |
| 3.2.10 | Überprüfung des Krankheitsstatus des kontroversen Anlageträgers W0277 | 55 |
| 4 | ERGEBNISSE | 57 |
| 4.1 | Allgemeine Übersicht..... | 57 |
| 4.2 | Kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungs-Kartierung auf BTA4 | 58 |
| 4.3 | Vergleichende Kartierung per Fall-Kontroll-Assoziationsanalyse | 58 |
| 4.4 | Identifizierung eines gemeinsamen Haplotypen auf BTA4 | 61 |
| 4.5 | Nutzung von Sequenzdaten aus dem <i>1000 Bull Genomes Project</i> | 61 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.6 | Gezielte Genotypisierungen für zwei Kandidaten-SNPs per PCR-RFLP..... | 64 |
| 4.6.1 | Überprüfung widersprüchlicher Ergebnisse bezüglich des SNP an Position 49 878 773 bp | 65 |
| 4.6.2 | Überprüfung widersprüchlicher Ergebnisse bezüglich des SNP an Position 50 858 538 bp | 68 |
| 4.7 | Schätzung der Frequenz der Kandidaten-Mutation in einer Stichprobe von Braunvieh-Tieren aus der genomischen Evaluation..... | 68 |
| 4.8 | Schätzung der Haplotypenfrequenz und Überprüfung der Kandidatenmutation in anderen Rassen..... | 69 |
| 4.9 | Überprüfung des Anlageträgerstatus von Tier W0277..... | 70 |
| 5 | DISKUSSION | 74 |
| 5.1 | Vor- und Nachteile des Probenmaterials | 74 |
| 5.2 | Vergleich der Kartierungsmethoden | 74 |
| 5.3 | Ermittlung von Kandidatengenomen und Kandidaten-SNPs | 76 |
| 5.4 | Überprüfung des Krankheitsstatus eines kontroversen Anlageträgers | 81 |
| 5.5 | Rolle der Mutation in der genetisch aktiven Braunvieh-/Brown Swiss-Population sowie in anderen Rassen | 82 |
| 5.6 | Ausblick | 84 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 86 |
| 7 | SUMMARY | 88 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 90 |
| 9 | ANHANG | 106 |
| 10 | DANKSAGUNG | 124 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| ACO | Alberta Composite |
| AFLP | amplifizierter Fragmentlängen-Polymorphismus |
| ALT | alternatives Allel |
| ANG | Angus |
| ANG_R | Red Angus |
| Anh. | Anhang |
| ASPE | allelspezifische Primer-Verlängerung |
| AYR | Ayrshire |
| BBL | Weißblaue Belgier |
| BBO | Beef Booster |
| bp | Basenpaar(e) |
| BPDME | bovine progressive degenerative Myeloenzephalopathie (Weaver-Syndrom) |
| BS | Brown Swiss |
| BTA | Rinderchromosom |
| BV | Braunvieh |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| ca. | circa |
| CHA | Charolais |
| Chr | Chromosom |
| CI | Konfidenzintervall |
| cLDLA | kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungsanalyse |
| cm | Centimeter |
| cM | Centimorgan |
| COM | Composite |
| CTTNBP2 | Cortactin Binding Protein 2 |
| d. h. | das heißt |
| DANR | Dänisches Rotvieh |

| | |
|--------------------|---|
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| Dr. | Doktor |
| D _{RM} | diplotype relationship matrix |
| e.V. | eingetragener Verein |
| ERI | Eringer |
| et al. | et alii/aliae |
| FRET | Fluorescence Resonance Energy Transfer |
| FV | Fleckvieh |
| G | Guanin |
| GAL | Galloway |
| GCOM | Guelph Composite |
| G _{RM} | additive genetic relationship matrix |
| GV | Gelbvieh |
| GWAS | genomweite Assoziationsstudie |
| HER | Hereford |
| High | Schottisches Hochlandrind |
| HOL | Holstein |
| IBD | Identity by descent, Herkunftsgleichheit |
| IBS | Identity by state, Zustandsgleichheit |
| inkl. | inklusive |
| iPLA _{2γ} | Calcium-independent Phospholipase A _{2γ} |
| JER | Jersey |
| KASP | kompetitive allelspezifische PCR |
| kb | Kilobase(n) |
| LD | linkage disequilibrium, Kopplungsungleichgewicht |
| LIM | Limousin |
| LMU | Ludwig-Maximilians-Universität |
| LocIBD | Locus-IBD |
| LOD | logarithm of the odds |
| LRT | likelihood ratio test statistic |
| M | maternal |
| MAF | minor allele frequency |
| Mb | Megabase(n) |

| | |
|----------|---|
| MON | Montbéliarde |
| MS | Mikrosatellit |
| NOR | Normande |
| NRCAM | Neuronal Cell Adhesion Molecule |
| OBV | Original Braunvieh (Braunvieh alte Zuchtrichtung) |
| P | paternal |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PCR-RFLP | kombinierte Methode aus Polymerase-Kettenreaktion und Analyse von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen |
| PIE | Piedmonteser |
| PNPLA8 | Patatin-like Phospholipase Domain Containing 8 |
| Prof. | Professor |
| QTL | quantitative trait locus/loci |
| RDC | Red Dairy Cattle |
| RED | Rotes Holstein-Rind |
| REF | Referenzallel |
| RFLP | Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROM | Romagnola |
| SAL | Salers-Rind |
| SBE | Einzelbasenverlängerung |
| SIFT | Sorting Intolerant From Tolerant |
| SIM | Simmental |
| SMA | spinale Muskelatrophie |
| sn-2 | stereospecific numbering position 2 |
| SNP | Einzelbasenpolymorphismus |
| sog. | sogenannte(r) |
| SSLP | einfacher Sequenzlängenpolymorphismus |
| SSR | kurze Sequenzwiederholung |
| STR | einfache Tandemwiederholung |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| TierLID | Labornummer des jeweiligen Tieres |
| TU | Technische Universität |

| | |
|---------|---|
| TYR | Tiroler Grauvieh |
| UAR | unified additive relationships |
| unkn | Rasse unbekannt |
| US | United States |
| USA | United States of America |
| v. Chr. | vor Christus |
| VNTR | Tandemwiederholungen variabler Anzahl |
| z. B. | zum Beispiel |
| ZAR | Zentrale Arbeitsgemeinschaft österreichischer Rinderzüchter |
| ZNS | Zentralnervensystem |

Abbildungsverzeichnis/Tabellenverzeichnis

Abbildungen

| | | |
|----------------------|--|----|
| Abbildung 1: | Braunvieh-Kuh auf der Weide | 4 |
| Abbildung 2: | Farbvarianten beim Braunvieh | 4 |
| Abbildung 3: | Ataxie der Hinterhand I | 24 |
| Abbildung 4: | Ataxie der Hinterhand II | 24 |
| Abbildung 5: | Niederstürzen in hundesitzige Stellung | 25 |
| Abbildung 6: | Erkennungssequenzen und verwendete Primer der PCR-RFLP für den SNP an Position 49 878 773 bp | 51 |
| Abbildung 7: | Erkennungssequenzen und verwendete Primer der PCR-RFLP für den SNP an Position 50 858 538 bp | 52 |
| Abbildung 8: | Vergleich des Konfidenzintervalls aus der <i>cLDLA</i> mit einer Liste annotierter Gene in <i>Ensembl</i> | 59 |
| Abbildung 9: | Vergleich der Ergebnisse der Homozygotie- Kartierungen mit und ohne Phänokopien mit den Ergebnissen der <i>cLDLA</i> (inkl. Phänokopien) | 60 |
| Abbildung 10: | Position, Struktur und Auswirkungen des Kandidaten- SNP an Position 49 878 773 bp | 62 |
| Abbildung 11: | Vergleiche der Proteinsequenz von iPLA _{2γ} zwischen verschiedenen Spezies | 63 |
| Abbildung 12: | Genotypen und Haplotypen im Pedigree der W0277- Familie | 71 |

Tabellen

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabelle 1: | Verwendete Software | 36 |
| Tabelle 2: | Verwendete Datenbanken und Suchwerkzeuge | 36 |
| Tabelle 3: | Mikrosatelliten-Marker des indirekten Gentests | 37 |
| Tabelle 4: | Erwartete Restriktionsfragmente und entsprechende Genotypen bei der PCR-RFLP für den SNP an Position 49 878 773 bp | 51 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabelle 5: | Erwartete Restriktionsfragmente und entsprechende Genotypen bei der PCR-RFLP für den SNP an Position 50 858 538 bp | 53 |
| Tabelle 6: | Konflikte zwischen angenommenem Krankheitsstatus und Ergebnissen der gezielten Genotypisierungen | 64 |
| Tabelle 7: | Vergleich der Haplotypen der Tiere mit abweichenden PCR-RFLP Genotypen mit dem gemeinsamen Weaver-Haplotypen | 66 |
| Tabelle 8: | Ermittlung der Frequenz der Kandidaten-Mutation in einer Stichprobe aus den Geburtenjahrgängen 2013 bis 2015 | 69 |
| Tabelle 9: | Ergebnisse der gezielten Genotypisierungen von heterozygoten Trägern des Weaver-Haplotypen aus anderen Rassen für den SNP Chr4:49 878 773 bp | 69 |
| Tabelle 10: | Ergebnisse der gezielten Genotypisierungen für die beiden Kandidaten-SNPs der W0277-Familie | 70 |
| Tabelle 11: | Positionen der in den Weaver-verdächtigen Nachkommen von W0277 ermittelten Homozygotiesegmente | 73 |

Anhangsübersicht

| | | |
|------------------|---|-----|
| Anhang 1: | Zusammensetzung der Testpopulationen | 106 |
| Anhang 2: | Ermittlung eines geeigneten Restriktionsenzym für die gezielte Genotypisierung des SNP an Position 49 878 773 bp per PCR-RFLP | 107 |
| Anhang 3: | Ermittlung eines geeigneten Restriktionsenzym für die gezielte Genotypisierung des SNP an Position 50 858 538 bp per PCR-RFLP | 108 |
| Anhang 4: | Ermittlung des gemeinsamen Weaver-Haplotypen auf BTA4 | 109 |
| Anhang 5: | Auswertung von Sequenzdaten aus dem <i>1000 Bull Genomes Project</i> | 113 |

1 Einleitung

Wer offenen Auges durch das Allgäu wandert, kommt an Rindern einer bestimmten Rasse nicht vorbei: dem Braunvieh. Mit ihrer namensgebenden Fellfarbe und dem dunklen Flotzmaul, das von einem hellen Saum umgeben ist, prägen sie das Erscheinungsbild vieler Weiden und Almen dieses Landstrichs. Als LEIPOLD et al. im Jahre 1973 an der Kansas State University drei Vertretern der Rasse Brown Swiss, den amerikanischen Verwandten des europäischen Braunviehs, gegenüberstanden, waren es jedoch nicht die äußerlichen Vorzüge dieser Rinder, die den Wissenschaftlern ins Auge stachen. Stattdessen beobachteten sie, dass die Tiere in Stand und Bewegung auffällig schwankten und mit fortschreitendem Alter zunehmend nicht mehr in der Lage waren, sich auf ihren Beinen zu halten, bis sie schließlich ganz festlagen und aus Tierschutzgründen euthanasiert werden mussten (LEIPOLD et al., 1973). Auslöser dieser Symptome war die bovine progressive degenerative Myeloenzephalopathie, aufgrund des „webenden“ Ganges der Tiere auch kurz Weaver-Syndrom genannt. Etwas über ein Jahrzehnt nach der Erstbeschreibung dieser rezessiven Erbkrankheit durch die amerikanischen Wissenschaftler (LEIPOLD et al., 1973) tauchten die gleichen Bilder auch auf der anderen Seite des Atlantiks auf. Durch den Import von amerikanischen Brown Swiss-Bullen bzw. deren Sperma war das auslösende Gen unbemerkt in die europäische Braunviehpopulation gelangt (TENHUMBERG et al., 1994) und hatte sich dort angereichert, so dass nun aus Verpaarungen von Anlageträgern die ersten kranken Tiere hervorgingen.

Durch konsequenten Ausschluss von Tieren mit zwei oder mehr erkrankten Nachkommen sowie Einsatz eines indirekten Gentests, welcher auf der Kopplung des Weaver-Locus mit sechs Mikrosatelliten beruhte (GEORGES et al., 1993; MEDJUGORAC et al., 1996), gelang es in den folgenden Jahren, eine weitere Ausbreitung des Weaver-Syndroms einzudämmen und das Auftreten neuer Erkrankungsfälle zu verhindern. Das auslösende Gen blieb jedoch weiterhin unbekannt. Im Jahr 2013 veröffentlichten MCCLURE et al. eine Studie, in welcher sie 41 Einzelbasenpolymorphismen (SNPs) und einen Weaver-Haplotypen als neue diagnostische Hilfsmittel vorstellten. Durch Anwendung dieser Methode wurde eine Reihe bisher unbekannter Anlageträger identifiziert, deren

Stammbäume jedoch ausschließlich Weaver-freie Vorfahren aufwiesen, was unter den Züchtern zu allgemeiner Verunsicherung bezüglich der Frequenz des Gens in der aktuellen Population führte.

Ziel dieser Arbeit war es daher, durch eine Feinkartierung und anschließende Kandidatengenanalyse die dem Weaver-Syndrom im Braunvieh zugrundeliegende(n) Mutation(en) zu identifizieren und damit den Grundstein für einen verlässlichen direkten Gentest zu legen. Ein erneutes Auftreten dieser Erbkrankheit könnte damit verhindert und die langfristige Erhaltung einer gesunden Braunvieh-/Brown Swiss-Population sichergestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in zusammengefasster Form am 22.09.2015 bei *Genetics Selection Evolution* eingereicht und am 09.03.2016 zur Veröffentlichung akzeptiert.

2 Literaturübersicht

2.1 Rassegeschichte Braunvieh

Braunvieh ist nicht gleich Braunvieh. Generell muss heutzutage unterschieden werden zwischen der ursprünglichen Zweinutzungsrasse „Original Braunvieh“, der milchbetonten Zweinutzungsrasse „Braunvieh“ mit mehr oder weniger großem Brown Swiss-Blutanteil und den „Brown Swiss“ selbst, der in den USA gezüchteten Milchrasse. Der Einfachheit halber wird in den folgenden Abschnitten der Oberbegriff Braunvieh für alle drei Gruppen verwendet und nur dann gesondert unterschieden, wenn auf spezielle Charakteristika eingegangen werden soll. Der Schwerpunkt soll zudem hauptsächlich auf der Braunviehpopulation in Deutschland liegen, ähnliche Sachverhalte können jedoch auch für die Populationen in Österreich und der Schweiz angenommen werden.

Aufgrund der zum Teil getrennt verlaufenden Entwicklungen der Subpopulationen, die unter dem Oberbegriff des Braunviehs zusammengefasst werden, handelt es sich beim Braunvieh um eine stratifizierte Population. Eine genauere Erläuterung dieses Begriffs sowie der Gefahren für genetische Studien findet sich in Kapitel 3.2.3.3.

2.1.1 Charakteristika

Charakteristisch für das Braunvieh (Abb. 1) ist die namensgebende Fellfärbung, welche verschiedenste Schattierungen zwischen sehr hellem Graubraun und Dunkelbraun annehmen kann (ALLGÄUER ORIGINAL BRAUNVIEHZUCHTVEREIN E.V., 2010; SAMBRAUS, 2011; BROWN SWISS CATTLE BREEDERS' ASSOCIATION, 2014c). Im Inneren der Ohrmuscheln, an den Innenseiten der Gliedmaßen und im vorderen Brustbereich ist das Fell bei beiden Geschlechtern etwas heller als am restlichen Körper, bei den grundsätzlich meist etwas dunkleren Bullen tritt häufig ein Aalstrich auf. Klauen, Nasenspiegel und Hornspitzen sind dunkel pigmentiert und um Augen und Flotzmaul findet sich ein heller Saum (FRAHM, 1990). Als Farbvarianten können ein weißer Gürtel

(DRÖGEMÜLLER et al., 2009) oder die den Pinzgauern ähnliche Färbung „Blüem/Ryf“ (DURKIN et al., 2012) auftreten (Abb. 2).

Die Größe dieser mittelrahmigen Rinder variiert vom etwas kleineren Original Braunvieh, bei dem die Kühe eine Widerristhöhe von 130–140 cm erreichen (RINDERUNION BADEN-WÜRTTEMBERG E.V., 2014), über durchschnittlich 134 cm bei Brown Swiss (HEINRICHS & HARGROVE, 1994) bis hin zu 138–152 cm bei dem mit Brown Swiss gekreuzten Braunvieh (SCHÄFER & ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHES BRAUNVIEH, 1996).



Abbildung 1: Braunvieh-Kuh auf der Weide
(Quelle: private Aufnahme)



Abbildung 2: Farbvarianten beim Braunvieh
Linkes Rind „Blüem/Ryf“, rechtes Rind mit weißem Gürtel.
(Quelle: Viehhandel Scherrer, Schweiz)

Charakterlich zeichnet sich das Braunvieh durch sein ruhiges, gutmütiges Temperament aus (ENGELER, 1947). Seine Langlebigkeit, Robustheit und ein stabiles Fundament (ENGELER, 1947) in Verbindung mit bestens für die Käserei geeigneter Milch mit hohen Kappa-Kasein B Gehalten (DE MARCHI et al., 2008; WEIß et al., 2013) machen es zu einer beliebten Rasse, welche in über 60 Ländern rund um den Globus anzutreffen ist (FAO, 2007).

2.1.2 Anfänge der Rasse Braunvieh

Der gemeinsame Ursprung der verschiedenen Braunviehschläge ist in den Alpenregionen Mitteleuropas anzusiedeln. Knochenfunde aus Pfahlbauten in der nordöstlichen Schweiz, welche auf in etwa das Jahr 4000 v. Chr. zurückdatiert werden konnten, liefern durch starke Ähnlichkeiten im Skelett erste Hinweise auf die Vorfahren des heutigen Braunviehs (SPAHR & OPPERMANN, 1995). Aus diesem Torf- bzw. Pfahlbaurind wurden unterschiedlich schwere Braunviehschläge herausgezüchtet, die auch den Ausgangspunkt für die Braunviehpopulationen der umliegenden Nachbarländer bildeten. Bereits ab dem 15. Jahrhundert fanden in großem Stil Exporte in das europäische Ausland statt, wo sich aus den regionalen Beständen dann eigene Populationen entwickelten (FELIUS et al., 2014).

In der Schweiz selbst lag der Schwerpunkt der Zuchtarbeit im Kanton Schwyz (FRAHM, 1990). Hier machten sich vor allem die Benediktiner-Mönche des Klosters Einsiedeln um das Braunvieh verdient (SAMBRAUS, 2011) und führten zwischen 1775 und 1782 sogar ein eigenes Herdbuch (FELIUS, 2007). 1897 wurde der „Verband Schweizerischer Braunviehzucht-Genossenschaften“, der Vorläufer des Schweizer Braunviehzuchtverbandes, gegründet; das zugehörige Herdbuch wurde im Jahr 1911 eröffnet (ENGELER, 1947).

2.1.3 Brown Swiss

Den Sprung über den großen Teich machte die Rasse im Jahr 1869, als H. M. Clark aus Belmont, Massachusetts, einen Bullen und sieben Kühe aus der Schweiz nach Amerika importierte (ROBERTS, 1916). In den

anschließenden Jahrzehnten folgten weitere Tiere, bis mit Auftreten der Maul- und Klauenseuche im Jahr 1906 sämtliche Importe eingestellt wurden (BRIGGS & BRIGGS, 1980). Von den rund 150 Tieren, welche bis dahin nach Amerika gelangt waren, stammen sämtliche Brown Swiss-Bestände in den USA ab, wobei sich die einzelnen kleinen Populationen zunächst über mehrere Bundesstaaten verteilten und kaum Austausch von genetischem Material untereinander stattfand (YODER & LUSH, 1937). Ein erster Zusammenschluss der Züchter erfolgte im Jahr 1880 mit Gründung der *Brown Swiss Cattle Breeders' Association* (BROWN SWISS CATTLE BREEDERS' ASSOCIATION, 2014a). Im Gegensatz zu ihren europäischen Verwandten, welche dem Zweinutzungstyp angehörten, wurde bei der Zucht der Brown Swiss der Schwerpunkt auf die Milchleistung gesetzt (SAMBRAUS, 2011). Mit der offiziellen Anerkennung als Milchrasse im Jahr 1906 und ersten Erfolgen in der *National Dairy Show* wurde die gemeinsame Zuchtarbeit ausgeweitet und nun auch verstärkt zwischen den einzelnen Beständen gekreuzt (YODER & LUSH, 1937).

In den 1960er Jahren fanden die Brown Swiss ihren Weg zurück nach Europa, als zur genetischen Aufwertung der dortigen Braunvieh-Bestände Brown Swiss-Bullen und Sperma importiert wurden (siehe Kapitel 2.1.4) (AVERDUNK & GOTTSCHALK, 1975; SCHULTE-COERNE, 1976; SÖLKNER et al., 1998).

Die heutige Brown Swiss-Population in den USA zählt rund 55 000 registrierte Tiere (BROWN SWISS CATTLE BREEDERS' ASSOCIATION, 2014b). Die Bundesstaaten mit der höchsten Braunvieh-Dichte sind dabei Wisconsin, Iowa und Ohio (FELIUS, 2007).

2.1.4 Deutsches Braunvieh (Braunvieh × Brown Swiss)

Vorherrschende Braunvieh-Gebiete in Deutschland sind das Alpenvorland und die daran anschließenden Bergregionen, vornehmlich das bayerische und württembergische Allgäu (FRAHM, 1990; SAMBRAUS, 2011).

Beim Allgäuer Dachs, dem Schlag des Braunviehs, welcher Anfang des 19. Jahrhunderts in diesen Regionen zu finden war, handelte es sich um ein kleines, feinknochiges Rind von fast grauer Farbe (ENGELER, 1947). Um

1800 fielen knapp zwei Drittel des bayerischen Bestandes der Rinderpest zum Opfer. Durch Vernachlässigung der Zuchtarbeit ab Mitte des 19. Jahrhunderts, als sich viele Landwirte im Zuge der expandierenden Milchwirtschaft große Gewinne durch wahllosen Zukauf von billigen Milchkühen erhofften, wurde der ursprüngliche Schlag weiter dezimiert (KUSTERMANN et al., 1996). Importe aus der Schweiz und Österreich ersetzten die durch die fehlende Nachzucht entstandenen Lücken und trugen zur endgültigen Verdrängung des einheimischen Braunviehs bei (ENGELER, 1947). Weitere Importe aus Österreich fanden im Rahmen der Tuberkulose- und Brucellose-tilgung nach dem zweiten Weltkrieg statt (MÜLLER, 1958).

Ab Herbst 1966 wurde in Bayern schließlich mit dem Import von Sperma amerikanischer Brown Swiss-Bullen begonnen (AVERDUNK & GOTTSCHALK, 1975), um das Braunvieh gezielt hin zu einer größerrahmigen, stärker milchbetonten Zweinutzungsrasse mit verbesserter Euterform und Melkbarkeit zu verändern (KRÄUSSLICH, 1981). Im Angesicht der Konkurrenzsituation mit leistungsstarken Milchrassen wie z. B. Holstein-Friesian erwartete man sich von der Einkreuzung von Brown Swiss den dringend benötigten Zuchtfortschritt (KOEGL, 1975). Auch in Baden-Württemberg ging man davon aus, durch Einkreuzungsmaßnahmen den langsamen Zuchtfortschritt beschleunigen (OTT, 1973) und mit verbesserter Milchleistung die Konkurrenzfähigkeit des Braunviehs gegenüber anderen Rassen aufrecht erhalten zu können (SCHULTE-COERNE, 1976). Da die charakteristische braune Fellfarbe als Markenzeichen erhalten bleiben sollte, entschied man sich auch hier für Brown Swiss als einzukreuzende Rasse. Nach einem eigens erstellten Einkreuzungsplan wurden in den folgenden Jahren Brown Swiss-Stiere an heimische Bullenmütter angepaart und mit den Kreuzungstieren weitergezüchtet (SCHULTE-COERNE, 1976).

Die anfängliche Veredelungskreuzung nahm mit der Zeit immer mehr die Züge einer Verdrängungskreuzung an (KUSTERMANN et al., 1996). Dabei kam es durch den bis heute andauernden Einsatz von Brown Swiss in der Braunviehzucht zu einer zunehmenden Anhäufung von Brown Swiss-Genen in den jeweiligen Braunviehpopulationen. In der Schweiz wird von einem Genanteil von über zwei Dritteln mit steigender Tendenz ausgegangen (HAGGER, 2005), ähnliche Werte können auch für die deutsche und die

österreichische Population (starker Einsatz von Brown Swiss-Sperma ab den frühen 1970er Jahren (SÖLKNER et al., 1998)) angenommen werden.

Aktuell (Stand 01.10.2015) sind rund 112 000 Braunvieh-Kühe bei der Allgäuer Herdebuchgesellschaft registriert (ALLGÄUER HERDEBUCHGESELLSCHAFT, 2015).

2.1.5 Original Braunvieh

Die Einkreuzung von Brown Swiss in das Deutsche Braunvieh ab Mitte der 1960er Jahre führte zu einer zunehmenden Verdrängung des ursprünglichen Wirtschaftstyps. Durch Einstellung des Prüfbulleneinsatzes in den 1970er Jahren (KUSTERMANN & PIRCHNER, 1995) und das Ende des Besamungseinsatzes von Original Braunvieh-Bullen im Jahr 1981 wurde dieser Prozess zusätzlich verstärkt (KUSTERMANN, 1994). Um den Niedergang des einheimischen Braunviehs zu verhindern, gründeten Züchter aus Bayern und Baden-Württemberg 1988 die „Arbeitsgemeinschaft Original Braunvieh“, aus welcher 1995 der „Allgäuer Original Braunvieh Zuchtverein e.V.“ hervorging. Durch Rückgriff auf in der Genreserve eingelagertes Sperma von Original Braunvieh-Bullen gelang es, einen weiteren Rückgang der Tierzahlen zu verhindern und den Bestand systematisch auszubauen (ALLGÄUER ORIGINAL BRAUNVIEHZUCHTVEREIN E.V., 2015). Ergänzend kamen Importe aus der mit rund 20 000 Tieren deutlich größeren Schweizer Original Braunvieh-Population hinzu (KUSTERMANN et al., 1996).

Beim heutigen Original Braunvieh, das 1992 als eigenständige Rasse anerkannt wurde (KUSTERMANN, 1994), sind zwei Kategorien zu unterscheiden. Kategorie A werden all jene Tiere zugerechnet, die 100 % reinrassig sind, d. h. keinen Brown Swiss-Genanteil tragen. Diese Reinrassigkeit wird durch einen lückenlosen Nachweis der Abstammung bis zu einem vorgegebenen Stichtag (01.01.1969 in Bayern, 01.01.1968 in Baden-Württemberg) gewährleistet (ALLGÄUER ORIGINAL BRAUNVIEHZUCHTVEREIN E.V., 2011). Kategorie B beinhaltet Original Braunvieh mit lückenhaften Abstammungsnachweisen (ALLGÄUER ORIGINAL BRAUNVIEHZUCHTVEREIN E.V., 2011) und Tiere mit einem Brown Swiss-Blutanteil von bis zu 12,5 % (SCHÄFER &

ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHES BRAUNVIEH, 1996). Der im Herdbuch eingetragene Bestand ist auf mittlerweile 361 Kühe und 8 Bullen in Bayern und 220 Kühe und 13 Bullen in Baden-Württemberg (Stand 2014) angewachsen (ALLGÄUER ORIGINAL BRAUNVIEHZUCHTVEREIN E.V., 2015), insgesamt aber dennoch vergleichsweise klein. Von der Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen e.V. wurde das Original Braunvieh neben dem Glanrind und dem Deutschen Schwarzbunten Niederungsrind zur „Gefährdeten Nutztier rasse des Jahres 2016“ erklärt (GESELLSCHAFT ZUR ERHALTUNG ALTER UND GEFÄHRDETER HAUSTIERRASSEN E.V., 2015).

2.2 Kartierung von Genen

2.2.1 Einteilung kartierter Merkmale

Zu kartierende Merkmale können in zwei Kategorien eingeteilt werden: qualitative und quantitative Merkmale (BERRY et al., 2011).

Als qualitativ werden all jene Merkmale bezeichnet, deren Phänotyp eindeutigen Kategorien zugeordnet werden kann, wie z. B. Fellfarbe oder Vorhandensein bzw. Abwesenheit von Hörnern (WORKU, 2015). Qualitativen Merkmalen liegt meist nur ein einziges Gen zugrunde, sie werden also monogen vererbt (PLOMIN et al., 2009). Der Einfluss der Umwelt ist vernachlässigbar klein (WORKU, 2015), so dass vom Phänotyp direkt auf den Genotyp geschlossen werden kann (ANDERSSON & GEORGES, 2004).

Merkmale, welche nicht in deutlich abgrenzbare Kategorien fallen, sondern eine kontinuierliche Verteilung ihres Phänotyps zeigen, werden quantitative Merkmale genannt (OLSEN et al., 2004). Beispiele für solche Merkmale, die sich auf einer durchgehenden Skala darstellen lassen, sind Milchmenge und -zusammensetzung oder Körpergröße. Da diese Merkmale in ihrer Ausprägung durch eine Vielzahl von Genen und Umwelteffekten beeinflusst werden, kann der Genotyp nicht direkt vom Phänotyp abgeleitet werden (MEUWISSEN et al., 2002). Für einen Abschnitt des Genoms, der Gene bzw. Gengruppen mit Einfluss auf die Ausprägung eines quantitativen Merkmals enthält, wird die Bezeichnung *quantitative trait locus* (QTL) verwendet (GELDERMANN, 1975).

2.2.2 Genetische Marker

Um Gene zu kartieren, benötigt man Bezugspunkte im Genom. Diese Funktion wird durch Marker erfüllt (GELDERMANN, 2005). Grundsätzlich lassen sich dabei drei verschiedene Typen von DNA-Markern unterscheiden: Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (*restriction fragment length polymorphisms*, RFLPs), Mikrosatelliten (*simple sequence length polymorphisms*, SSLPs) und Einzelbasenpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) (BROWN, 2007).

Für Kartierungen ist entscheidend, dass die genetischen Marker einen hohen Grad an Polymorphie aufweisen (GUO & ELSTON, 1999). Nur wenn zwei oder mehr Allele vorhanden sind und heterozygote Genotypen vorliegen, können Rekombinationen nachverfolgt und Kandidatenloci eingengt werden. Je höher die Anzahl der beobachteten Rekombinationsereignisse und je dichter die Marker dabei über das Genom verteilt sind, desto genauer kann am Ende kartiert werden (GEORGES, 2007).

2.2.2.1 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen

Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) waren die erste Art von DNA-Markern, die genauer studiert wurden (BROWN, 2007). Ihre Funktionsweise beruht auf folgendem Prinzip: Restriktionsenzyme schneiden die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen und erzeugen so Fragmente unterschiedlicher Länge (BOTSTEIN et al., 1980). Liegen an einer Erkennungsstelle zwei Allele und damit Polymorphismus vor, kann das Restriktionsenzym seine Funktion nur dann ausführen, wenn das passende Allel vorhanden ist. In allen anderen Fällen wird die Schnittstelle nicht erkannt und die DNA verbleibt in einem Stück (BROWN, 2007). Alternativ kann durch das Auftreten eines neuen Allels auch eine zusätzliche Schnittstelle erzeugt werden, so dass nun zwei Restriktionsfragmente anstelle eines durchgehenden DNA-Fragments auftreten (GELDERMANN, 2005).

Zur Analyse von RFLPs werden die im Restriktionsverdau entstandenen Fragmente in einer Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt, per Blotting auf eine Membran übertragen und mit radioaktiv markierten Sonden detektiert (BOTSTEIN et al., 1980). Die in Kapitel 3.2.7 genauer beschriebene PCR-RFLP Methode schaltet dem Restriktionsverdau einen Vervielfältigungsschritt per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vor, in welchem die zu untersuchenden DNA-Abschnitte mithilfe passender Primer amplifiziert werden. Nach Auftrennung im Agarosegel und Sichtbarmachung können die entsprechenden Genotypen anhand der Fragmentlängen direkt abgelesen werden. Auf diese Weise können schnell und einfach gezielte Genotypisierungen von SNPs vorgenommen werden (OTA et al., 2007).

Bezüglich Genkartierungen besitzen die biallelischen RFLPs den Nachteil, dass sie in den meisten Fällen homozygot auftreten und der Informationsgrad daher relativ gering ist (WELLER, 2001). Zusätzlich ist die Genotypisierung von RFLPs in ausreichend großen Zahlen vergleichsweise zeit- und kostenintensiv (KRUGLYAK, 1997).

Ist der Vervielfältigungsschritt gezielter Fragmente per PCR dem Restriktionsverdau nachgeschaltet, spricht man von amplifizierten Fragmentlängenpolymorphismen (*amplified fragment length polymorphisms*, AFLPs) (VOS et al., 1995). AFLPs haben den Nachteil, dass sie dominant auftreten (Bande vorhanden bzw. nicht vorhanden) und daher keine Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Genotypen getroffen werden kann (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999).

2.2.2.2 Mikrosatelliten

Unter Tandem-Wiederholungen (*tandem repeats*) versteht man tandemartige Aneinanderreihungen von sich wiederholenden DNA-Sequenzmotiven im Genom. Anhand der Länge der Wiederholungseinheiten wird zwischen Mini- und Mikrosatelliten unterschieden (GELDERMANN, 2005).

Minisatelliten bestehen aus repetitiven Einheiten mit einer Länge von 6–100 bp und werden alternativ auch als Tandemwiederholungen variabler Anzahl (*variable number of tandem repeats*, VNTRs) bezeichnet (VERGNAUD & DENOEUDE, 2000).

Für kürzere Sequenzen von meist 1–4 bp, maximal jedoch 10 bp, welche ca. 5–15 Mal pro Locus wiederholt werden, verwendet man die Bezeichnung Mikrosatelliten. Alternativ werden auch die Begriffe einfache Tandemwiederholungen (*simple tandem repeats*, STR), einfache Sequenzlängenpolymorphismen (*simple sequence length polymorphisms*, SSLP) oder kurze Sequenzwiederholungen (*short sequence repeats*, SSR) gebraucht (GELDERMANN, 2005). Aufgrund ihrer dichten Verteilung über das gesamte Genom und ihres ausgeprägten Polymorphismus eignen sie sich besonders gut als genetische Marker (IHARA et al., 2004). Der hohe Grad an Polymorphismus ergibt sich dabei aus der variablen Anzahl an Wiederholungen des Sequenzmotivs (WEBER & MAY, 1989).

Ein weiterer Vorteil der Mikrosatelliten besteht darin, dass sie mit relativ geringem Aufwand in nur zwei Schritten genotypisiert werden können: Nach Vervielfältigung mithilfe der PCR wird eine Gelelektrophorese durchgeführt, welche die unterschiedlich langen Mikrosatelliten ihrer Größe nach auftrennt, so dass der Genotyp aus dem resultierenden Bandenmuster abgelesen werden kann (TAUTZ, 1989; WEBER & MAY, 1989). Als Analysemethode mit höherem Automatisationsgrad wird heutzutage meist die Kapillarelektrophorese eingesetzt (WENZ et al., 1998). Im Vergleich zu SNP-Chips bleibt eine automatische Genotypisierung der Mikrosatelliten dennoch vergleichsweise schwierig, so dass sie zunehmend von den SNPs als Mittel der Wahl für genetische Studien und Kartierungen abgelöst werden (BALL et al., 2010). Weitere Gründe sind die mangelnde Wiederholbarkeit und damit Genauigkeit der Genotypisierungen (VIGNAL et al., 2002) und das Phänomen der Homoplasie. Homoplasie liegt vor, wenn Mikrosatelliten-Allele bezüglich ihrer Länge übereinstimmen, jedoch unterschiedliche genetische Varianten innerhalb ihrer Wiederholungssequenz aufweisen. Da die Allele bei reiner Betrachtung der Länge nicht voneinander zu unterscheiden sind, können diese Sequenzunterschiede, die wichtige populationsgeschichtliche Informationen beinhalten, ohne eine zusätzliche Sequenzierung nicht erkannt und genutzt werden (GARZA & FREIMER, 1996).

2.2.2.3 Einzelbasenpolymorphismen

In Abständen von 0,1–1 kb auftretende DNA-Varianten an einzelnen Nukleotidpositionen werden Einzelbasenpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*), kurz SNPs, genannt (GELDERMANN, 2005). Vergleicht man also die DNA-Sequenzen von Individuen mit einer Referenzsequenz, tritt ca. alle 1000 Basenpaare ein alternatives Allel anstelle des Referenzallels auf. Theoretisch sind mehrere alternative Allele möglich, in den meisten Fällen sind SNPs jedoch biallelisch (VIGNAL et al., 2002).

Im Vergleich zu Mikrosatelliten liegt der Vorteil der SNPs sowohl in ihrer höheren Stabilität und geringeren Mutationsrate, als auch in der höheren Frequenz, mit welcher sie im Genom auftreten und selbst mikrosatellitenarme Bereiche abdecken (WELLER, 2001). Da die Markerdichte einen starken

Einfluss auf die erzielte Kartierungsgenauigkeit hat (GEORGES, 2007), sind SNPs trotz ihrer biallelischen Natur und der daher vergleichsweise geringen Informativität (BALL et al., 2010) besonders gut für den Einsatz in Kartierungen geeignet. Durch die Entwicklung automatisierter Genotypisierungsmethoden wurde zudem eine Möglichkeit geschaffen, schnell und kostengünstig den Genotyp für eine große Anzahl von SNPs zu bestimmen (CHEN & SULLIVAN, 2003). Mit dem Illumina BovineHD Genotyping BeadChip können beispielsweise 777 962 SNPs für bis zu acht Proben parallel genotypisiert werden (ILLUMINA INC., 2015). Eine detaillierte Beschreibung der Funktionsweise solcher SNP-Chips findet sich in Kapitel 3.2.3.1.2.

SNPs dienen jedoch nicht nur als genetische Marker, teilweise handelt es sich bei den gesuchten Mutationen selbst um einen Einzelbasenaustausch. Treten im codierenden Bereich von Genen alternative Allele anstelle des Referenzallels auf, kann dies Auswirkungen auf das zugehörige Proteinprodukt haben (NG & HENIKOFF, 2003). Man unterscheidet in diesem Zusammenhang synonyme und nicht-synonyme Mutationen. Bei nicht-synonymen Mutationen wird durch das alternative Allel das Basentriplett so verändert, dass es entweder zum Einbau einer abweichenden Aminosäure in das Proteinprodukt (*Missense-Mutation*) oder sogar zum Kettenabbruch (*Nonsense-Mutation*) kommt (GRAUR, 2003). Funktionsveränderungen bis hin zum Totalausfall sind die Folge. Bei synonymen Mutationen wird das Basentriplett ebenfalls verändert, es codiert jedoch noch immer für dieselbe Aminosäure, so dass die Aminosäuresequenz des Genprodukts letztendlich nicht verändert wird. Aus diesem Grund spricht man auch von „stillen“ Mutationen (SHASTRY, 2009). Da bei der Übersetzung in ein Protein jedoch bestimmte Basentriplets bevorzugt werden (*codon bias*), sind synonyme Mutationen nicht automatisch folgenlos, sondern haben beispielsweise Einfluss auf die Genexpression, die RNA-Verarbeitung in Vorbereitung auf die Translation (PLOTKIN & KUDLA, 2011) und sogar die Proteinfaltung (CORTAZZO et al., 2002).

2.2.3 Genkarten

Die Kartierung von Genen dient dem Zweck, ihre Lage auf den Chromosomen bzw. ihre Abstände zueinander zu bestimmen (GELDERMANN, 2005). Dabei lassen sich grundsätzlich zwei verschiedene Kategorien von Genkarten unterscheiden: genetische und physikalische Genkarten (ZHANG et al., 2004).

Bei der genetischen Kartierung wird unter Einsatz von Methoden wie z. B. Kreuzungsexperimenten und Analyse von Stammbäumen die Position eines Gens im Genom ermittelt (BROWN, 2007). Kopplungskarten in Centimorgan (cM) und *Linkage disequilibrium*-Karten in LD-Einheiten zählen zu dieser Kategorie (ZHANG et al., 2004).

Physikalische Karten umfassen Genkarten mit der Einheit *base pairs* (bp) (MORTON, 2005) sowie Karten, die Chromosomenbanden zur Lokalisierung verwenden (ZHANG et al., 2004). Sie geben die genaue Position von Genen bzw. Sequenzvarianten auf dem DNA-Molekül an (BROWN, 2007).

Ihren Ausgang nahm die Kartierung von Genen mit der Entdeckung des Phänomens der Kopplung.

2.2.3.1 Kopplung (*Linkage*)

Um die Jahrhundertwende fielen den Wissenschaftlern Bateson, Saunders und Punnett bei ihren Kreuzungsexperimenten Abweichungen von Mendels dritter Regel auf (BATESON et al., 1905; BATESON & PUNNETT, 1911), welche eine unabhängige Weitergabe und Neukombination der Erbanlagen zwischen Eltern- und Nachkommengeneration postulierte (MENDEL, 1866). Das von ihnen beobachtete Phänomen der Kopplung (*linkage*) beschreibt die Tendenz von Genen, in bestimmten Kombinationen häufiger aufzutreten als dies bei unabhängiger Vererbung zu erwarten wäre. Grundlage der Kopplung ist die Anordnung der Gene auf dem Chromosom bzw. ihr Abstand zueinander. Eng beieinander liegende Erbanlagen werden durch Segmentaustausch per *Crossing-over* mit geringerer Wahrscheinlichkeit voneinander getrennt als Strukturen, die sich weit voneinander entfernt auf dem Chromosom befinden, und werden daher häufiger gemeinsam weitergegeben (MORGAN, 1911; MORGAN et al., 1915).

2.2.3.1.1 Kopplungsgleichgewicht und Kopplungsungleichgewicht

Betrachtet man zwei Loci auf demselben Chromosom mit jeweils zwei Allelen A und a an Locus 1 sowie B und b an Locus 2, so erhält man als Aufstellung aller möglichen Allelkombinationen: A_B, A_b, a_B und a_b. Wenn für jede dieser Kombinationen gilt, dass die Frequenz des gemeinsamen Auftretens beider Allele gleich dem Produkt ihrer Einzelfrequenzen ist, spricht man von unabhängiger Vererbung der Allele bzw. Kopplungsgleichgewicht (*linkage equilibrium*) (TERWILLIGER & WEISS, 1998).

Kopplungsungleichgewicht (*Linkage disequilibrium*, LD) bezeichnet die nicht zufällige Assoziation von Allelen an zwei oder mehr Loci (NORDBORG & TAVARE, 2002). Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass das gemeinsame Auftreten zweier Allele häufiger bzw. weniger oft beobachtet wird, als bei unabhängiger Vererbung zu erwarten wäre (LEWONTIN & KOJIMA, 1960; PRITCHARD & PRZEWORSKI, 2001). LD beruht nicht zwingend auf der Kopplung von Genen, sondern kann eine Reihe verschiedenster Ursachen haben. Selektion, Genfluss, genetische Drift, Mutationen, gemeinsame Vorfahren bzw. Inzucht oder das Auftreten genetischer Flaschenhälse tragen alle zu Abweichungen von unabhängiger Vererbung bei (LEWONTIN, 1988; SLATKIN, 2008). Das Vorhandensein von LD liefert daher Informationen über historische Vorgänge in der untersuchten Population (NORDBORG & TAVARE, 2002).

Im Zusammenhang mit Mutationen entsteht Kopplungsungleichgewicht auf folgende Weise: Eine neu auftretende Mutation auf einem Chromosom ist zu Beginn erst einmal einzigartig und tritt daher mit einer niedrigen Frequenz in der Population auf. Gleichzeitig steht sie in vollkommenem LD zu den Allelen an all den anderen Loci auf dem Chromosom, mit welchen sie gemeinsam vererbt wird. Im Laufe der Zeit kommt es zu Rekombinationen, wodurch sich der ursprüngliche Haplotyp verändert. Für Allele, die eng mit der Mutation gekoppelt sind, ist die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination geringer als für Allele, welche über weitere Strecken in LD mit der Mutation stehen. LD nimmt also über größere Entfernungen vergleichsweise schneller ab und bleibt über eng gekoppelte Bereiche länger bestehen (BROOKES, 1999; SLATKIN, 2008).

Ist die Mutation eng mit einem Allel gekoppelt, welches einem vorteilhaften Phänotyp zugrunde liegt, und wird gezielt auf diesen Phänotyp gezüchtet bzw. selektiert, steigt neben der Frequenz des gewünschten Allels automatisch auch die Frequenz des gekoppelten Allels in der Population an (SLATKIN, 2008). Dieser Vorgang der Frequenzerhöhung durch Selektion auf ein benachbartes Allel in starkem LD wird „genetisches Hitchhiking“ genannt (MAYNARD & HAIGH, 2007).

2.2.3.2 Kopplungskartierungen (*linkage mapping*)

Kopplungskartierungen machen sich die auf der *Linkage*-Theorie basierende Entdeckung von STURTEVANT (1913) zunutze, dass bei linearer Anordnung der Gene auf dem Chromosom die Rekombinationsraten durch *Crossing-over* zwischen den einzelnen Genen als Maß für ihren Abstand voneinander verwendet werden können. Sind die Austauschhäufigkeiten für drei verschiedene Gene A, B und C, welche sich auf demselben Chromosom befinden, bekannt, so lässt sich ihre Reihenfolge auf folgende Weise bestimmen: Liegen die Gene in der Reihenfolge A, B, C hintereinander, ergibt sich die Rekombinationsrate zwischen A und C (AC) aus der Summe von AB und BC. Liegt C jedoch zwischen A und B (Reihenfolge A, C, B), ist die Rekombinationsrate zwischen A und C gleich der Differenz von AB und BC. Auf dieser Grundlage wurde für sechs geschlechtsgebundene Gene von *Drosophila* die erste Genkarte überhaupt erstellt (STURTEVANT, 1913).

Zur Kartierung von z. B. krankheitsauslösenden Genen wird die gemeinsame Segregation von Phänotyp und Genmarkern in bekannten Stammbäumen nachverfolgt (ABDALLAH et al., 2004). Tritt eine bestimmte Kombination zwischen Marker-Allelen und untersuchtem Phänotyp überdurchschnittlich häufig auf, kann eine Kopplung des Krankheits-Gens mit diesen Markern angenommen und die Lokalisation des Genortes eingegrenzt werden (OLSEN et al., 2004). Die dabei verwendete Kartierungseinheit von 1 Centimorgan (cM) entspricht einer Rekombinationsrate von 1 % (HALDANE, 1919). Die für eine Umrechnung in Basenpaare (bp) benötigten Faktoren variieren sowohl innerhalb des Genoms (rekombinationsreiche und -arme Chromosomenabschnitte) (YU et al., 2001), als auch zwischen den

verschiedenen Spezies: Im menschlichen Genom entspricht 1 Centimorgan im Durchschnitt ca. 1 Million Basenpaaren (1 Mbp) (ARNHEIM et al., 2003). Für Rinder wurden Umrechnungsfaktoren zwischen 1,23 cM/Mb (WENG et al., 2014) und 1,25 cM/Mb (ARIAS et al., 2009) bzw. nach Geschlechtern unterschiedene Werte von 0,986 Mb/cM für männliche und 1,085 Mb/cM für weibliche Tiere angegeben (MA et al., 2015).

Der Nachteil von Kopplungs-Kartierungen besteht in ihrer geringen Kartierungsgenauigkeit, welche selten eine höhere Auflösung als 1 cM erreicht. Innerhalb dieser relativ großen Bereiche gestaltet sich das Auffinden eines kausalen Gens schwierig (HÄSTBACKA et al., 1992). Durch Erhöhung der Markerdichte kann die Auflösungsgenauigkeit ebenfalls nicht gesteigert werden, da zwischen eng gekoppelten Markern nur selten Rekombinationen auftreten und daher ein Zuwachs an Informativität ausbleibt (OLSEN et al., 2004).

Kopplungs-Kartierungen eignen sich außerdem relativ schlecht für quantitative Merkmale, da die Segregation der Marker mit dem Phänotyp aufgrund der schwach ausgeprägten Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp schwer nachzuverfolgen ist (ABDALLAH et al., 2004).

2.2.3.3 Kopplungsungleichgewichts-Kartierungen (*linkage disequilibrium mapping*)

Kartierungen auf der Basis von Kopplungsungleichgewicht werden auch Assoziationskartierungen genannt (ARNHEIM et al., 2003). Im Vergleich zu Kopplungskartierungen, welche sich ausschließlich auf die Rekombinationen innerhalb der Pedigrees der untersuchten Testpopulation konzentrieren (MEUWISSEN & GODDARD, 2000), stützt sich diese Methode auf Rekombinationen, welche in der Entwicklungsgeschichte der untersuchten Population auftraten und Einfluss auf das Auftreten und die Ausprägung von Kopplungsungleichgewicht hatten (HÄSTBACKA et al., 1992; GEORGES, 2007). Durch Einbezug dieser großen Anzahl historischer Rekombinationen wird eine höhere Kartierungsgenauigkeit erzielt (GEORGES, 2007).

Wie in Kapitel 2.2.3.1.1 bereits beschrieben, nimmt Kopplungsungleichgewicht zwischen eng gekoppelten Markern langsamer ab als zwischen

Markern, die auf dem Chromosom weiter voneinander entfernt liegen und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Trennung durch Rekombination aufweisen. In der direkten Umgebung eines Allels, das zum Beispiel ursächlich für eine bestimmte Erbkrankheit ist, sollte sich also stets ein bestimmter Haplotyp finden, der den durch Rekombinationen mehr oder weniger verkleinerten Rest des ursprünglichen Haplotyps zum Zeitpunkt der Entstehung der Mutation darstellt (HÄSTBACKA et al., 1992). Um diesen Bereich enger Kopplung und damit starken LD aufzuspüren, testet man eine Reihe von über das Genom bzw. über ein spezifisches Chromosom verteilten Markern auf ihre Assoziation mit dem Auftreten des untersuchten Phänotyps. In dem dabei eingegrenzten Chromosomenabschnitt befindet sich mit hoher Wahrscheinlichkeit das ursächliche Allel (TERWILLIGER & WEISS, 1998; BROOKES, 1999). Die vor allem bei qualitativen Merkmalen am häufigsten angewendete Methode stellen Fall-Kontroll-Studien dar. Durch Vergleich der Marker-Allelfrequenzen zwischen Individuen mit (Fallgruppe) und ohne den betrachteten Phänotyp (Kontrollgruppe) werden chromosomale Bereiche mit einem hohen Grad an Assoziation identifiziert (JORDE, 2000). Die in dieser Arbeit verwendete ASSHOM-Methode nach CHARLIER et al. (2008) wird in Kapitel 3.2.4 genauer beschrieben.

Da Kopplungsungleichgewicht wie in Kapitel 2.2.3.1.1 beschrieben jedoch auch auf anderen Phänomenen als Kopplung beruhen kann, ist bei all diesen Studien besondere Vorsicht bezüglich falsch positiver Ergebnisse durch beispielsweise Populationsstratifikation (HINRICHS et al., 2009), genetische Drift oder Vermischung von Subpopulationen (GORROOCHURN, 2008) walten zu lassen. Diese Gefahr ist im Rindergenom besonders deutlich ausgeprägt, da durch die genannten Faktoren LD über weite Strecken und selbst chromosomenübergreifend besteht (FARNIR et al., 2000).

2.2.3.4 Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungs-Kartierungen (*linkage disequilibrium and linkage mapping*)

Kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungsstudien (*combined linkage disequilibrium and linkage analysis*, cLDLA) stützen sich sowohl auf informative Rekombinationen innerhalb der genotypisierten Pedigrees als

auch auf Informationen aus historischen Rekombinationen in den weiter zurückliegenden, nicht genotypisierten Generationen (MEUWISSEN et al., 2002). Auf diese Weise kann eine weitere Erhöhung der Kartierungsgenauigkeit erreicht werden (FARNIR et al., 2002). Der Vorteil gegenüber reinen Kopplungsstudien besteht darin, dass auch unverwandte Individuen außerhalb eines gemeinsamen Pedigrees einbezogen werden können und selbst Marker mit homozygotem Genotyp Informationen liefern (PÉREZ-ENCISO, 2003). Zusätzlich werden falsch positive Ergebnisse durch das Auftreten von LD, welches nicht auf einer Assoziation mit dem untersuchten Phänotyp beruht oder sogar über einzelne Chromosomen hinaus besteht, durch den Einbezug von Kopplungs-Informationen vermieden (FARNIR et al., 2000).

Erste Kartierungen mithilfe von Kopplung und Kopplungsungleichgewicht wurden von FARNIR et al. (2002) und MEUWISSEN et al. (2002) durchgeführt. Die in dieser Arbeit vorliegende Kartierung des Weaver-Gens erfolgte in enger Anlehnung an die Methode von MEUWISSEN et al. (2002) und wird im Abschnitt „Material und Methoden“ genauer beschrieben.

2.3 Das Weaver-Syndrom

Bei vielen Rinderrassen, welche gezielt auf bestimmte Merkmale selektiert werden, ist die effektive Populationsgröße trotz zum Teil hoher Tierzahlen relativ klein (GEORGES, 2007). Durch verstärkten Einsatz einer kleinen Gruppe von Spitzenvererbern in der künstlichen Besamung kommt es zu einem Verlust an genetischer Variabilität, während der Verwandtschaftsgrad und damit der Grad an Inzucht zunehmend ansteigt (MAIGNEL et al., 1996; CHARLIER et al., 2008). Als Begleiterscheinung kommt es dabei immer wieder zum Auftreten von rezessiven Erbkrankheiten (CHARLIER et al., 2008). Bei den amerikanischen Brown Swiss, die eine Gründerpopulation von nur rund 150 Tieren und eine noch geringere effektive Populationsgröße (YODER & LUSH, 1937) sowie einen hohen Grad an Inzucht aufwiesen, war es aufgrund des extensiven Einsatzes ausgewählter Bullen in der künstlichen Besamung (SPAHR & OPPERMANN, 1995) nur eine Frage der Zeit, bis Erbfehler in Erscheinung traten.

2.3.1 Geschichte

Das Weaver-Syndrom, auch bovine progressive degenerative Myeloenzephalopathie (BPDME) genannt, ist eine rezessiv vererbte neurodegenerative Erkrankung, die bei Brown Swiss-Rindern sowie Braunvieh mit Brown Swiss-Blutanteil auftritt (BRAUN et al., 1987; TRELA, 1991; DOLL et al., 1993). Erstmals beschrieben wurde sie durch LEIPOLD et al. (1973), die bei zwei reinrassigen Braunvieh-Färsen und einem Bullen einen „eigentümlich webenden Gang“ (engl. „weaver“ – Weber) beobachteten, welcher sich zunehmend bis hin zum Festliegen verschlechterte. Ausgehend von den USA traten in den folgenden Jahren auch Fälle in der Schweiz (BRAUN et al., 1987), Kanada (BAIRD et al., 1988), Deutschland (HAFNER et al., 1991; TRELA, 1991) und Italien (BALDRIGHI et al., 1992) auf, welche auf die Einkreuzung von amerikanischen Brown Swiss in das europäische Braunvieh zurückzuführen waren (TENHUMBERG et al., 1994). Die wichtigsten Anlageträger in Deutschland waren dabei ZELAD und AUTSOWIK (SCHÄFER &

ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHES BRAUNVIEH, 1996), welche beide von US-Bullen abstammten. Außerhalb des Braunviehs wurde durch GOETZE et al. (1985) ein Fall von Weaver-Syndrom bei einem Anglerrind mit Brown Swiss Vorfahren beschrieben. Auch beim Roten Dänischen Milchrind kam es nach Einkreuzung von amerikanischen Brown Swiss zum Auftreten von Weaver-Fällen (AGERHOLM, 2007).

2.3.2 Symptome

Charakteristisch für die Symptome einer Erkrankung am Weaver-Syndrom ist ihr stets progressives Fortschreiten (STUART & LEIPOLD, 1983b; TRELA, 1991). Wann die ersten Symptome einsetzen und wie schnell sie fortschreiten ist jedoch von Tier zu Tier unterschiedlich (TRELA, 1991), so dass bei einem sehr langsamen Verlauf und entsprechend unterstützendem Handling bisweilen ein Alter von knapp 4 Jahren erreicht werden kann (DOLL et al., 1993).

Bei den erkrankten Tieren fällt auf, dass der Anteil der weiblichen Tiere deutlich überwiegt (STUART & LEIPOLD, 1983a; TRELA, 1991; DOLL et al., 1993). Es wird angenommen, dass die Ursache dafür im betriebsspezifischen Management liegt: Bullenkälber verlassen bereits in jungem Alter den Hof und gehen in die Mast bzw. werden früh geschlachtet, so dass eventuell auftretende Symptome nur sehr schwach bzw. überhaupt nicht zur Ausprägung kommen (STUART & LEIPOLD, 1983a; TRELA, 1991; DOLL et al., 1993). Eine Geschlechtsprädisposition wird daher weitgehend ausgeschlossen (STUART & LEIPOLD, 1983a; TRELA, 1991).

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Erkrankungsfälle gehäuft in Familien bestimmter Zuchtlinien mit hohem Blutanteil nordamerikanischer Brown Swiss auftraten. Unter den Vorfahren dieser Tiere fanden sich einige Bullen auffallend oft als Väter bzw. Mutterväter wieder (TRELA, 1991). Beobachtungen bei reinrassigen Brown Swiss-Tieren bestätigten diese Annahme eines familiären Zusammenhangs (STUART & LEIPOLD, 1983b).

2.3.2.1 Frühstadium

STUART und LEIPOLD (1983b) beschrieben erste Symptome im Alter von 5–8 Monaten, welche über einen Zeitraum von 12–18 Monaten hin zu hochgradig ataktischen Störungen zunahmen. Da die Symptome im Anfangsstadium des Weaver-Syndroms zum Teil nur äußerst gering ausgeprägt und daher schwer wahrzunehmen sein können, empfiehlt sich eine Nachuntersuchung nach 2–3 Wochen (TRELA, 1991). Die Symptome umfassen vor allem Schwächeerscheinungen und geringgradige Bewegungsstörungen der Nachhand, welche sich in Schwierigkeiten beim Aufstehen und einem ataktischen Gangbild äußern (STUART & LEIPOLD, 1983b; TRELA, 1991). In der allgemeinen klinischen Untersuchung finden sich keinerlei Auffälligkeiten, Allgemeinbefinden und Futteraufnahme sind ungestört (TRELA, 1991).

2.3.2.2 Fortgeschrittenes Stadium

Das Fortschreiten der Erkrankung manifestiert sich in einer zunehmenden Nachhandlähmung bei ungetrübtem Sensorium (STUART & LEIPOLD, 1983b; TRELA, 1991). Eine Überprüfung der Gehirnnervenfunktion ergibt keinerlei Auffälligkeiten und spinale Reflexe sind erhalten (STUART & LEIPOLD, 1983b; BRAUN et al., 1987; TRELA, 1991). Durch seitlichen Druck auf die Hüfte können betroffene Tiere zum Niederstürzen gebracht werden (STUART & LEIPOLD, 1983b; TRELA, 1991). Versuchen sie aus dem Liegen in eine stehende Position zu kommen, geschieht dies meist auf unsichere, schwankende Weise (TRELA, 1991).

Auch im Stand selbst ist „webendes“ Schwanken der Nachhand zu beobachten (STUART & LEIPOLD, 1983b; TRELA, 1991). Die Hintergliedmaßen werden oft unphysiologisch breit oder eng, zum Teil auch weit nach vorne bzw. hinten gestellt, die Fesseln sind steil und Überköten tritt häufig auf (STUART & LEIPOLD, 1983b; TRELA, 1991). Stellungskorrekturen bei künstlich herbeigeführten unphysiologischen Beinstellungen erfolgen verzögert (BRAUN et al., 1987; TRELA, 1991).

In der Bewegung werden Schritte unsicher-stolpernd, breitbeinig (Abb. 3, Abb. 4) und bisweilen hypo- bzw. hypermetrisch gesetzt (STUART &

LEIPOLD, 1983b; TRELA, 1991). Beim Führen auf gerader Linie kommt es in einigen Fällen aufgrund von Gleichgewichtsstörungen und Koordinationsproblemen bereits zu Stürzen in eine hundesitzige Stellung (Abb. 5); durch plötzliche Wendungen werden diese Symptome verstärkt (BRAUN et al., 1987; TRELA, 1991). Längere Bewegung führt zu Erschöpfungserscheinungen, die Tiere zeigen höherfrequente Atmung sowie Tremor an Hals-, Rumpf- und Hintergliedmaßenmuskulatur (TRELA, 1991).



Abbildung 3: Ataxie der Hinterhand I
Breitbeinig gesetzte Schritte der Vorderhand, Einknicken in der Hinterhand, Stolpern und Überköten.
(Quelle: Prof. Ueli Braun, Universität Zürich)



Abbildung 4: Ataxie der Hinterhand II
Breitbeinig gesetzte Schritte der Vorderhand, seitliches Schwanken der Hinterhand.
(Quelle: Prof. Ueli Braun, Universität Zürich)



Abbildung 5: Niederstürzen in hundesitzige Stellung
(Quelle: Prof. Ueli Braun, Universität Zürich)

2.3.2.3 Endstadium

Unbeeinträchtigt Allgemeinzustand und Sensorium sowie ungestörte Futteraufnahme bleiben auch bis ins Endstadium des Weaver-Syndroms erhalten (TRELA, 1991; DOLL et al., 1993). Erkrankte Tiere liegen in Brust-Seitenlage fest, durch die maximal ausgeprägten Koordinationsstörungen sind Stehen und Gehen nicht mehr möglich. Propriozeption ist ebenfalls nicht mehr vorhanden (TRELA, 1991). Einigen Tieren gelingt es noch sich in eine hundesitzige Stellung aufzurichten (DOLL et al., 1993), aus welcher sie jedoch nach kürzester Zeit wieder niederbrechen (TRELA, 1991). In Folge der physischen Anstrengung und der daraus resultierenden psychischen Aufregung sind Zittern der Hals-, Rumpf- und Gliedmaßenmuskulatur, eine erhöhte Atem- und Herzfrequenz sowie Schwitzen, Stöhnen und Brüllen zu beobachten (TRELA, 1991). Dieser Zustand ist mit dem Tierschutz nicht mehr vereinbar und eine Euthanasie bzw. Schlachtung wird unumgänglich (DOLL et al., 1993).

2.3.3 Pathologie

2.3.3.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung geschlachteter bzw. euthanasierter Weaver-Tiere fallen an Groß- und Kleinhirn makroskopisch keinerlei Veränderungen auf (STUART & LEIPOLD, 1985; EL HAMIDI et al., 1990; TRELA, 1991). Nach STUART und LEIPOLD (1985) kann das Rückenmark im Vergleich zu gesunden Tieren jedoch einen geringeren Durchmesser aufweisen.

Des Weiteren beobachteten STUART und LEIPOLD (1985) atrophische Veränderungen der Muskulatur der Hintergliedmaße, vor allem der Strecker von Hüfte und Knie, sowie fokale hämorrhagische und nekrotische Läsionen, Fibrosen und Ersatz von atrophierter Muskulatur durch Fettgewebe. Diese Veränderungen werden als Folgeerscheinungen des Festliegens im Endstadium bzw. der durch Niederstürzen verursachten Traumata eingeordnet (STUART & LEIPOLD, 1983b; TRELA, 1991).

2.3.3.2 Pathologisch-histologische Untersuchung

Die Anwendung pathologisch-histologischer Methoden führt zu folgenden Ergebnissen: Läsionen und Veränderungen finden sich vor allem in der Substantia alba des Rückenmarks (STUART & LEIPOLD, 1985; BRAUN et al., 1987; BAIRD et al., 1988; HAFNER et al., 1991; FIEDLER, 1994). Ihre Verteilung ist bilateral symmetrisch (FIEDLER, 1994) mit der höchsten Dichte im kranialen Thorakalmark; Zervikal- und Lumbalmark zeigen sich in geringerem Ausmaß jedoch ebenfalls verändert (STUART & LEIPOLD, 1985; BRAUN et al., 1987; BAIRD et al., 1988; TRELA, 1991; FIEDLER, 1994). Periphere Bereiche der lateralen und ventralen Funiculi sind dabei stärker betroffen als Bereiche nahe der grauen Substanz, nach dorsal findet eine Ausbreitung entlang des ventralen medianen Septums statt (STUART & LEIPOLD, 1985). Weder in der grauen Substanz noch im peripheren Nervensystem können Veränderungen beobachtet werden (STUART & LEIPOLD, 1985; BRAUN et al., 1987; FIEDLER, 1994).

Charakteristisch sind vor allem die degenerativen Veränderungen der Axone, welche Axonschwellungen (Sphäroide), Desintegration der Markscheiden mit Verlust von Myelin sowie ausgeprägte axonale Atrophien bis hin zu völliger Auflösung der Axone (Status spongiosus) umfassen (STUART & LEIPOLD, 1985; BRAUN et al., 1987; BAIRD et al., 1988; EL HAMIDI et al., 1990; HAFNER et al., 1991; TRELA, 1991; FIEDLER, 1994). Nach STUART und LEIPOLD (1985) sind vor allem größere, stark myelinisierte Axone betroffen. Zudem kann eine Proliferation der Astroglia beobachtet werden (HAFNER et al., 1991; TRELA, 1991; FIEDLER, 1994).

Betroffene Gebiete im Hirnstamm konzentrieren sich auf die Pyramiden und die untere Olive, in welchen sich gelegentlich axonale Degenerationen und Axonverluste zeigen (STUART & LEIPOLD, 1985).

Im Kleinhirn finden sich Veränderungen in der Purkinje-Zellschicht, wo es stellenweise zu einem Kompletต์verlust an Purkinje-Zellen kommen kann, und in geringerem Ausmaß auch in der Körnerzellschicht der Rinde (STUART & LEIPOLD, 1985).

Die Pathogenese dieser Veränderungen ist unbekannt (STUART & LEIPOLD, 1985). STUART und LEIPOLD (1985) nehmen an, dass die Degeneration der Nervenfasern als Primärläsion anzusehen ist. OYSTER et al. (1992a) führten in einer Studie histochemische und morphometrische Analysen ausgewählter Skelettmuskeln durch und konnten dabei keinerlei signifikante Unterschiede zwischen erkrankten Tieren und der Kontrollgruppe feststellen. Eine primäre Ursache im Bereich der Muskulatur wird daher ausgeschlossen (OYSTER et al., 1992a).

2.3.4 Diagnose

Anhand ihrer Beobachtungen entwickelten STUART und LEIPOLD (1983b) vier grundlegende Kriterien, um die klinische Diagnose „Weaver-Syndrom“ treffen zu können:

- 1.) Die ersten Symptome in Form von bilateraler Hinterhandschwäche und Ataxie treten zwischen dem 5. und 8. Lebensmonat auf.

- 2.) Propriozeptive Reflexe sind herabgesetzt, ansonsten können keinerlei Ausfälle der motorischen und sensorischen Reflexe beobachtet werden. In der neurologischen Untersuchung ergeben sich ebenfalls keine weiteren Auffälligkeiten.
- 3.) An Skelett oder Muskulatur sind keinerlei klinisch relevante Veränderungen feststellbar.
- 4.) Erkrankte Tiere stehen in einem familiären Verwandtschaftsverhältnis zueinander.

Dabei müssen die ersten drei Kriterien zwingend erfüllt werden, das vierte Kriterium stellt eine zusätzliche Bestätigung dar (STUART & LEIPOLD, 1983b).

Um klinische Diagnosen abzusichern und eine Verwechslung mit ähnlichen Symptomen anderer Krankheiten auszuschließen, empfiehlt sich zusätzlich eine neuropathologische Untersuchung nach Schlachtung bzw. Euthanasie (TRELA, 1991). Für solche starken Ähnlichkeiten bzw. Übereinstimmungen im Phänotyp, denen jedoch andere Ursachen zugrunde liegen, wird der Begriff der Phänokopie (GOLDSCHMIDT, 1935) gebraucht. Ataxie und Parese der Hinterhand können neben dem Weaver-Syndrom auch durch Traumata, Läsionen und raumfordernde Prozesse (Abszesse, Neoplasien) im Rückenmark selbst bzw. seiner näheren Umgebung (DIVERS & PEEK, 2008) hervorgerufen werden. Als weitere Differentialdiagnose kommen verzögerte neurotoxische Effekte von Organophosphaten (NICHOLSON, 1974) in Frage. Werden solche Phänokopien, d. h. falsch positive Fälle, in Kartierungsstudien verwendet, kann dies zu fehlerhaften bzw. komplett ausbleibenden Ergebnissen führen, wie in den Kapiteln 4.3 und 5.2 genauer beschrieben wird.

2.3.5 Frequenz in der Braunvieh-/Brown Swiss-Population

Nach STUART und LEIPOLD (1983a) trat das Weaver-Syndrom in den 1980er Jahren mit einer geschätzten Frequenz von 5,6 % in der amerikanischen Brown Swiss-Population auf. HOESCHELE und MEINERT (1990) ermittelten eine ähnliche Genfrequenz von 6,27 %.

In der österreichischen Braunviehpopulation wurde die Frequenz des Weaver-Gens durch LINDAUER und ESSL (1994) mithilfe der Genflussmethode geschätzt. Ihre Ergebnisse zeigten für den Zeitraum zwischen 1975 und 1988 einen kontinuierlichen Anstieg des Weaver-Allels auf 4,92–5,08 % im weiblichen Teil der Population. Bei den Stieren zeigte die Verlaufskurve ebenfalls einen ansteigenden Verlauf mit zwei deutlichen Sprüngen: zwischen den Jahren 1974 und 1977 erreichte die Frequenz einen Wert von 2,9 % und stieg 1983 erneut sprunghaft an, um im Jahr 1986 einen Wert von 6,79 % zu erreichen (LINDAUER & ESSL, 1994). Deutliche Unterschiede zwischen der Anzahl der aus diesen Frequenzen errechneten und den tatsächlich auftretenden Erkrankungsfällen, welche ebenfalls von HOESCHELE und MEINERT (1990) beobachtet worden waren, ließen den Schluss zu, dass entweder lückenhaft getestet und erkrankte Tiere nicht konsequent gemeldet wurden, oder aber ein komplexerer Erbgang als angenommen vorliegen könnte (LINDAUER & ESSL, 1994). Mit Bekanntwerden des Weaver-Syndroms und dem Anlaufen erster Bekämpfungsmaßnahmen sank die Intensität des Zuchteinsatzes von Anlageträgern ab 1990 innerhalb von zwei Jahren von 5,34 % auf 1,25 %. Im Jahr 2005 wurden Anlageträger nur noch mit einer Intensität von 0,01 % eingesetzt. Das Weaver-Allel war jedoch immer noch mit einer Frequenz von rund 3,6 % in der Population vertreten (MANATRINON et al., 2009). Auch aus der amerikanischen Brown Swiss-Population war das Gen nicht vollständig eliminiert worden und herrschte 2001 noch mit einer geschätzten Frequenz von 2,6 % vor (VANRADEN et al., 2011). In den Aufzeichnungen des Instituts für Tierpathologie der LMU München wurde nach 1997 kein Weaver-Fall mehr dokumentiert, so dass aktuell von Weaver-Freiheit ausgegangen wird. Ob dieser Sachverhalt fehlerhaften Diagnosen und mangelnder Melde-disziplin geschuldet ist, oder ob nach 1997 wirklich keine Fälle mehr auftraten, ist ungeklärt.

2.3.6 Bisher durchgeführte Studien

2.3.6.1 Hoeschele und Meinert: Kopplung mit QTL für Milchmenge

HOESCHELE und MEINERT gingen 1990 in einer Studie der Frage nach, ob Carrier-Status für gewisse genetische Defekte Auswirkungen auf wirtschaftlich wichtige Leistungsmerkmale hat und wenn ja, in welchem Ausmaß. Ihre Ergebnisse für das Weaver-Syndrom deuteten darauf hin, dass Söhne von Anlageträgern, die selbst Weaver-Anlageträger waren, Töchter mit höherer Milchleistung hervorbrachten als Söhne ohne Anlageträger-Status. Diesem Selektionsvorteil in Bezug auf Milchmenge und Milchfett (Unterschied von 336,8 kg Milch und 13,0 kg Milchfett) war es möglicherweise geschuldet, dass Anlageträger in der Zucht bevorzugt wurden und es damit zu einer unbeabsichtigten Verbreitung und Frequenzerhöhung des Weaver-Allels in der Braunviehpopulation kam.

2.3.6.2 Georges et al.: Kopplung des Weaver-Locus mit TGLA116

Eine zur Überprüfung des Zusammenhanges zwischen dem Auftreten des Weaver-Syndroms und erhöhter Milchproduktion durchgeführte Kopplungsstudie von GEORGES et al. (1993) ergab, dass der Mikrosatelliten-Marker TGLA116 mit 3 % Rekombinationsfrequenz eine enge Kopplung mit dem Weaver-Locus aufweist. Eine Syntänie-Kartierung ordnete TGLA116 und den Weaver-Locus der bovinen Syntäniegruppe U13 zu. Ob eines der Gene aus dieser Gruppe als Kandidatengen für das Weaver-Syndrom in Frage kommt, wurde zum Gegenstand zukünftiger Forschung erklärt, genauso wie die nähere Untersuchung des QTL für Milchmenge (GEORGES et al., 1993). Die Kopplungsbeziehung zwischen dem Weaver-Locus und dem Mikrosatelliten TGLA116 lieferte die Basis für einen ersten indirekten Gentest zur Weaver-Diagnose. Unter der Voraussetzung, dass sich im Pedigree des zu testenden Tieres mindestens ein Anlageträger mit bekannter heterozygoter Kopplungsphase am Mikrosatelliten-Locus befindet, wurden Risikoanalysen mit 85–95 % Sicherheit im Falle eines positiven Ergebnisses durchgeführt. Für die Rekombinationsfrequenz zwischen dem Mikrosatelliten

und dem Weaver-Locus wurde dabei ein Wert von 0,05 angenommen (RUSS et al., 1994).

2.3.6.3 Erweiterung des indirekten Gentests und Einengung des Weaver-Locus

Dieser erste indirekte Weaver-Gentest führte aufgrund des geringen Polymorphismus und der ungünstigen Allelverteilung des Mikrosatelliten TGLA116 nur in rund 50 % der untersuchten Fälle zu einer signifikanten Aussage (RUSS et al., 1994). Durch Einbezug der fünf zusätzlichen Mikrosatelliten-Marker RM188, MAF50, RM067, BM1224 und BM6458, welche ebenfalls eine Kopplung mit dem Weaver-Locus aufwiesen (MEDJUGORAC et al., 1996), konnte der indirekte Gentest erweitert und verbessert werden.

Durch weitere Versuche, den Weaver-Locus genauer zu kartieren, konnte der Genort zudem auf einen ca. 10 Mb umfassenden Bereich zwischen den Markern BMS2646 (43,2 cM auf der MARC Karte) und MAF50 (51,2 cM) eingeeengt werden (DENISE & MEDRANO, 2005).

2.3.6.4 McClure et al.: weitere Einengung des Weaver-Locus, diagnostische SNPs und Weaver-Haplotyp

Im Jahr 2013 wiesen MCCLURE et al. auf die Gefahr hin, dass es seit Einführung des indirekten Gentests zu Rekombinationen zwischen dem Weaver-Allel und den diagnostischen Mikrosatelliten gekommen sein könnte. Durch falsch negative Testergebnisse potentieller Anlageträger wäre daher ein unbemerkter Anstieg der Frequenz des Weaver-Allels in der Brown Swiss-Population bzw. in Rassen mit Brown Swiss-Einkreuzung möglich (MCCLURE et al., 2013).

Um dieser Gefahr entgegenzuwirken, zielte die Studie von MCCLURE et al. (2013) darauf ab, einen diagnostischen Haplotypen und möglichst auch die kausale Mutation zu ermitteln. Mithilfe einer GWAS konnte der Weaver-Locus auf einen Bereich von 48–53 Mb auf BTA4 eingeeengt werden. Zusätzlich zu einem diagnostischen Haplotypen wurden 41 SNPs identifiziert, welche mit

dem Auftreten des Weaver-Syndroms einhergehen. Eine auffällige Häufung dieser SNPs fand sich im Bereich der Gene *NRCAM*, *PNPLA8* und *CTTNBP2*, so dass die Vermutung aufgestellt wurde, dass es sich bei einem der 37 SNPs distal von *NRCAM* bzw. dem nicht-synonymen SNP in *PNPLA8* um den Auslöser des Weaver-Syndroms handeln könnte. Für den Weaver-Haplotypen wurde zudem eine Frequenz von 0,03 in der Rasse Holstein ermittelt. Die kausale Mutation hinter dem Weaver-Syndrom konnte nicht identifiziert werden, allerdings gaben MCCLURE et al. an, dass mit der Kombination aus Haplotypenanalyse und Imputation der diagnostischen SNPs nun ein neues, kostengünstiges Hilfsmittel zur Weaver-Analyse zur Verfügung steht (MCCLURE et al., 2013).

Die Anwendung dieser Methode führte jedoch zu teilweise problematischen Ergebnissen. In den Pedigrees einiger potentieller Anlageträger, welche anhand des Weaver-Haplotypen und der diagnostischen SNPs identifiziert worden waren, konnte die Herkunft des Weaver-Alles nicht nachvollzogen werden, da sich keiner der bisher bekannten Anlageträger unter den Vorfahren befand. Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse wären lücken- bzw. fehlerhafte Aufzeichnungen der Abstammungsdaten. Falls es sich beim Weaver-Allel um eine relativ junge Mutation handelt, besteht auf genetischer Ebene außerdem die Möglichkeit, dass der ursprüngliche Haplotyp, vor dessen Hintergrund sie zum ersten Mal auftrat, noch mit relativ hoher Frequenz in der Population verbreitet ist und zu falsch positiven Ergebnissen führt. Alternativ wäre aber auch denkbar, dass eine Reihe von Anlageträgern aufgrund von Rekombinationen tatsächlich nicht mithilfe des Mikrosatelliten-Tests erfasst werden konnte und es sich bei den neu identifizierten Anlageträgern um Nachkommen eben jener Tiere handelt. Um die widersprüchlichen Ergebnisse restlos aufzuklären und den Weaver-Krankheitsstatus in Zukunft mit größtmöglicher Sicherheit zu bestimmen, wäre die Kenntnis der auslösenden Mutation von großem Vorteil.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zusammenstellung der Testpopulation

Für die Kartierung des Weaver-Gens wurde eine Testpopulation aus 160 Tieren zusammengestellt, welche sich in 34 Tiere der Rasse Original Braunvieh und 126 reinrassige Brown Swiss bzw. Braunvieh mit Brown Swiss-Blutanteil aufgliederte. Die Phänotypen waren in dieser Gruppe folgendermaßen verteilt: 86 Tiere waren Weaver-frei, 31 Tiere Anlageträger und 43 Tiere Merkmalsträger mit der Diagnose Weaver-Syndrom. Diese Gruppe bildete die Ausgangsbasis für alle weiteren Analysen. Die genaue Zusammenstellung der verwendeten Untergruppen inklusive zusätzlicher Tiere wird in den entsprechenden Kapiteln genauer beschrieben, eine Übersicht bietet Anhang 1.

3.1.2 Zuteilung der Phänotypen

In den 1980er und 1990er Jahren wurden Fälle des Weaver-Syndroms nach folgendem dreistufigen Schema diagnostiziert:

- (i) Eine erste Untersuchung von Tieren mit Weaver-verdächtiger Symptomatik erfolgte im heimischen Stall durch den Hoftierarzt, welcher auf Basis der klinischen Beobachtungen eine erste Diagnose stellte.
- (ii) Eindeutige Weaver-Fälle wurden anschließend mit Einverständnis des Landwirtes zur weiteren Beobachtung in die Klinik für Wiederkäuer der LMU München in Oberschleißheim transportiert.
- (iii) Bestätigten die Beobachtungen in der Klinik die Diagnose des Hoftierarztes, kam es im nächsten Schritt zur Euthanasie des betreffenden Tieres. Die pathologische Untersuchung erfolgte durch das Institut für Tierpathologie der LMU München.

Die zugehörigen Untersuchungsprotokolle aus den Jahren 1989 bis 1997 waren im Archiv des Instituts für Tierpathologie einsehbar und dienten als Hauptargument für die Zuteilung des Merkmalsträgerstatus. Für einige Tiere, welche als Merkmalsträger in den ebenfalls vorliegenden Probennahme-protokollen (Jahre 1989 bis 1995) vermerkt waren, konnte die Weaver-Diagnose jedoch nicht pathologisch überprüft werden. Dieser Sachverhalt lässt sich durch fehlende Kapazitäten der Tierpathologie zum Zeitpunkt der Euthanasie oder durch frühzeitigen Tod der Tiere erklären, so dass der dritte Schritt nach Stufe (i) und (ii) nicht mehr durchgeführt werden konnte. Nach TRELA (1991) kann eine Weaver-Erkrankung jedoch nur durch eine Kombination von positiver klinischer Untersuchung mit entsprechenden neuropathologischen Befunden nach Schlachtung bzw. Euthanasie sicher diagnostiziert werden, da z. B. durch angeborene Rückenmarksmissbildungen das Auftreten ähnlicher Symptome bei völlig anderer Ursache möglich ist. Aus diesem Grund wurde den Tieren in der Kartierungs-Population nur dann Merkmalsträger-Status zugeordnet, wenn die klinische Weaver-Diagnose durch einen pathologischen Befund gestützt werden konnte.

Die Zuteilung des Anlageträgerstatus erfolgte entweder anhand der Ergebnisse des Mikrosatelliten-Tests und der anschließenden Risikoanalyse (MEDJUGORAC et al., 1996), oder aber anhand des Auftretens von zwei Weaver-Nachkommen mit pathologischem Befund, deren korrekte Abstammung per Bluttest gewährleistet wurde. In die Kartierungsansätze gingen nur solche Anlageträger ein, deren Status durch mindestens zwei erkrankte Nachkommen abgesichert war. Für alle anderen Analysen wurden auch Anlageträger, welche nur einen direkten Nachkommen mit Weaver-Diagnose aufwiesen bzw. über den Mikrosatelliten-Test identifiziert worden waren, berücksichtigt.

Als Weaver-frei galten alle symptomlosen Tiere, die per Mikrosatelliten-Test als Anlageträger ausgeschlossen worden waren, unter deren Nachkommen sich keine am Weaver-Syndrom erkrankten Tiere befanden oder die zumindest das reproduktionsfähige Alter erreicht hatten (erste Symptome des Weaver-Syndroms mit 5–8 Monaten (STUART & LEIPOLD, 1983b)). Da für Original Braunvieh kein Fall von Weaver-Syndrom in der Literatur bekannt ist, wurden diese Tiere ebenfalls als Weaver-frei eingestuft.

3.1.3 Probenmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Blut- bzw. DNA-Proben stammten aus früheren Forschungsprojekten bzw. der routinemäßigen Weaver- und Abstammungsdiagnostik in den späten 1980er und frühen 1990er Jahren und waren in den Probensammlungen des Lehrstuhls für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre der LMU und der Tierzuchtforschung e.V. München in Grub eingelagert. Da seit 1997 kein offizieller Weaver-Fall mehr durch das Institut für Tierpathologie der LMU diagnostiziert worden war, konnten keine Proben von aktuellen Fällen einbezogen werden.

Für weiterführende Untersuchungen und pathohistologische Überprüfungen des Krankheitsstatus wurden Schnittpräparate von Rückenmark und Hirnstamm herangezogen. Diese standen für einen Teil der Merkmalsträger im Archiv des Instituts für Tierpathologie der LMU München zur Verfügung oder wurden, falls zusätzlich in Formalin fixierte Originalproben dieser Gewebe eingelagert waren, neu angefertigt.

3.1.4 Datenmaterial

Die in den Kartierungsansätzen zum Einsatz kommenden Genotypisierungsdaten lagen für 85 Weaver-freie Tiere, 28 Anlageträger und 12 Merkmalsträger in der Datenbank des Lehrstuhls für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre vor. Weitere Daten von drei Anlageträgern und einem Weaver-freien Tier wurden von Braunvieh Schweiz (Zug, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die Genotypen der restlichen 31 Merkmalsträger wurden wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben per Chip-Typisierung gewonnen.

Sequenzdaten aus *Run4* des *1000 Bull Genomes Project* wurden von Prof. Dr. Ruedi Fries und Dr. Hubert Pausch (TU München) ausgewertet. Mit einem speziell entwickelten Custom Chip gewonnene Genotypisierungsdaten von 14 531 Tieren verschiedener Rassen konnten anschließend in Zusammenarbeit mit Dr. Hermann Schwarzenbacher (ZuchtData GmbH/Rinderzucht Austria) auf den dabei ermittelten Kandidaten-SNP hin untersucht werden. Das Vorgehen und die Ergebnisse dieser Analysen werden in den Kapiteln 3.2.6 und 3.2.8 bzw. den Kapiteln 4.5 und 4.7 genauer beschrieben.

3.2 Methoden

3.2.1 Verwendete Software

Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Software inklusive des jeweiligen Verwendungszwecks findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Verwendete Software

| Programmname | Verwendungszweck und Quelle |
|------------------------------|--|
| ASREML | Varianzkomponentenanalyse GILMOUR et al. (2009) http://www.vsnr.co.uk/de/software/asreml/ |
| BEAGLE 3.0.4 | Haplotypisierung und Imputation von Genotypen BROWNING und BROWNING (2009) https://faculty.washington.edu/browning/beagle/b3.html |
| MICROSOFT SQL SERVER 2014 | Interne Datenhaltung (Genotypen, Haplotypen, Phänotypen) und Vorbereitung zur Analyse http://msdn.microsoft.com/de-de/sqlserver/default |
| MICROSOFT VISUAL STUDIO 2010 | Erstellung von Programmen zur Datenvorbereitung für diverse Analysen, für die Durchführung von Analysen selbst sowie die Darstellung von Analyseergebnissen https://www.visualstudio.com/ |
| R | Datenverarbeitung und grafische Darstellung R DEVELOPMENT CORE TEAM (2013) http://www.r-project.org/ |

3.2.2 Verwendete Datenbanken

Eine genaue Aufschlüsselung der in dieser Arbeit verwendeten Datenbanken und Suchwerkzeuge findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2: Verwendete Datenbanken und Suchwerkzeuge

| Datenbank/Suchwerkzeug | Quelle |
|---|---|
| BaZI Rind Landesanstalt für Landwirtschaft | http://www.lfl-design3.bayern.de/itz/rind/bazi/index.php |
| BLAST Assembled Genomes | ALTSCHUL et al. (1990) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |

| | |
|--|---|
| BrunaNet Braunvieh Schweiz | http://www2.braunvieh.ch/ArgusB/ |
| Ensembl | CUNNINGHAM et al. (2015) http://www.ensembl.org/index.html |
| REBASE® The Restriction Enzyme Database | ROBERTS et al. (2015) http://rebase.neb.com |
| ZuchtData Rinderzucht Austria | http://cgi.zar.at/cgi-bin/zw_default.pl |

3.2.3 Kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungs-Kartierung

3.2.3.1 Genotypisierung

3.2.3.1.1 Auswahl der zu genotypisierenden Tiere

Um die Gefahr falsch positiver Weaver-Fälle einzudämmen und somit die Erfolgsaussichten der Feinkartierung zu erhöhen, wurden für die Genotypisierungen ausschließlich Merkmalsträger mit pathologisch bestätigter Diagnose ausgewählt. Nach RUSS et al. (1999) befindet sich die wahrscheinlichste Position für den Weaver-Locus zwischen den Mikrosatellitenmarkern RM188 und TGLA116. Daher wurden als zweites Auswahlkriterium die Genotypen dieser Tiere für die sechs diagnostischen Mikrosatelliten-Marker (Tab. 3) herangezogen.

Tabelle 3: Mikrosatelliten-Marker des indirekten Gentests

Start- und Endpositionen der 6 Mikrosatelliten des indirekten Weaver-Gentests bzw. der Weaver-Risikoanalyse.

| Marker | Startposition (in bp) | Endposition (in bp) |
|---------|-----------------------|---------------------|
| RM188 | 24 244 690 | 24 244 709 |
| MAF50 | 54 768 441 | 54 768 558 |
| RM067 | 56 586 290 | 56 586 314 |
| TGLA116 | 57 877 692 | 57 877 716 |
| BM1224 | 59 959 184 | 59 959 204 |
| BM6458 | 73 300 787 | 73 300 808 |

Bevorzugte Kandidaten für die Chip-Genotypisierung waren solche Tiere, die im Bereich der ersten drei bzw. vier Marker (RM188, MAF50, RM67 und TGLA116) informative Rekombinationen aufwiesen, d. h. nicht homozygot für die Weaver-Phase waren. Dabei wurde darauf geachtet, eine möglichst große Bandbreite an Haplotyp-Varianten abzudecken.

Insgesamt wurde für die Genotypisierung so ein Tierset aus 31 Merkmalsträgern, welche in die anschließende Feinkartierung eingingen, sowie einem zusätzlichen Merkmalsträger und zwei Anlageträgern, die zur Rekonstruktion von Haplotypen benötigt wurden, jedoch nicht Teil der Kartierung waren, zusammengestellt.

3.2.3.1.2 Durchführung der Genotypisierung

Die Genotypisierung der 34 ausgewählten Tiere wurde durch die Tierzuchtforschung e.V. München in Grub mit dem Illumina BovineSNP50 v2 BeadChip (Illumina, San Diego, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Chip enthält 54 609 SNPs, welche mit einem durchschnittlichen Abstand von 49,4 kb gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sind und damit eine ausreichende SNP-Dichte für Assoziationsstudien liefern. Zudem können bis zu 24 Proben parallel analysiert werden. Die durchschnittliche *Call-Rate*, welche die Anzahl der korrekt abgerufenen SNPs angibt, beträgt >99 %, die durchschnittliche Frequenz des selteneren Allels des jeweiligen SNP (*minor allele frequency*, MAF) über alle Loci liegt bei 0,25. Ein weiterer Vorteil des BeadChip besteht darin, dass für die Genotypisierung nur ein einziger Probenansatz notwendig ist und die Durchführung einer PCR entfällt, wodurch sich das Risiko eines Fehlers durch mehrfache Probenbearbeitung im Labor verringert (ILLUMINA INC., 2012).

Der Funktionsweise eines solchen BeadChips liegen die folgenden vier Schritte zugrunde:

- 1.) Amplifizierung genomischer DNA aus den Proben, um genügend Material für den Hybridisierungsschritt zu gewinnen.
- 2.) Hybridisierung an spezifische und empfindlich reagierende Oligonukleotid-Fängersonden auf dem Chip.

- 3.) Auswertung der „eingefangenen“ SNPs mit einer enzymbasierten Methode; Biotin-markierte Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) werden an die passende Allelsonde angelagert (allelspezifische Primer-Extension, ASPE).
- 4.) Detektion und Signalverstärkung, um die eingebauten Markierungen abzulesen.

In Schritt 3 werden pro SNP zwei verschiedene allelspezifische Bead-Typen verwendet, deren Fänger-Sequenz sich nur in der 3'-terminalen Base unterscheidet. Die Base wird so gewählt, dass die Sonden auf den Beads jeweils Allel A und Allel B entsprechen. Nur wenn die Sequenz der „eingefangenen“ DNA mit der Sondensequenz am 3'-Ende übereinstimmt, kann der Strang durch die Polymerase mit den Biotin-markierten dNTPs verlängert werden. Anhand dieser Verlängerung, welche nur bei Basenpaarung stattfindet, können die vorliegenden SNPs identifiziert werden (GUNDERSON et al., 2005). Alternativ kann auch nur eine Sonde in einem Einzelbasen-Verlängerungsschritt (*single-base extension*, SBE) eingesetzt werden. Die Nukleotide sind dabei mit Markern versehen und können durch einen Sandwich-Assay unter Verwendung von zwei verschiedenen Farben identifiziert werden. Homozygote Allelkombinationen stellen sich dann jeweils in einer der beiden Farben dar, die heterozygote Kombination ergibt eine Mischfarbe (STEEMERS et al., 2006).

In der hauseigenen Datenbank bereits vorliegende Genotypisierungsdaten von 85 Weaver-freien Tieren, 28 Anlageträgern und 12 Merkmalsträgern wurden auf selbe Weise mit dem Vorgängermodell, dem Illumina BovineSNP50 v1 BeadChip, welcher 54 001 SNPs umfasst (ILLUMINA INC., 2012), gewonnen. Weitere Genotypisierungsdaten von drei Anlageträgern und einem Weaver-freien Tier wurden, wie im Abschnitt „Material“ bereits angemerkt, von Braunvieh Schweiz zur Verfügung gestellt.

Insgesamt lagen die SNP *Call-Rates* für alle genotypisierten Proben über der Ausschlussgrenze von 95 %, so dass die ermittelten Genotypen ausnahmslos für die folgenden Analysen verwendet werden konnten.

3.2.3.1.3 Qualitätskontrolle

In den folgenden Analysen diente die UMD 3.1 *Bos taurus* Assembly (ZIMIN et al., 2009) als Referenzgenom, auf welches die Positionen der SNPs bezogen wurden.

Um alle Marker auszuschließen, welche einen zu geringen Informationsgrad für die durchzuführenden Analysen aufwiesen, wurden die mit dem Chip abgerufenen SNPs nach folgendem Schema gefiltert und im Falle des Zutreffens eines der Kriterien ausgeschlossen:

- (i) Der Marker konnte in über 5 % der Tiere nicht erfolgreich genotypisiert werden.
- (ii) Der Marker führte zu häufigen Konflikten bezüglich der Abstammung von Tieren mit bekannter Verwandtschaft.
- (iii) Der Marker konnte nicht eindeutig bzw. gar nicht im Referenzgenom lokalisiert werden.
- (iv) Der Heterozygotiegrad des Markers lag unter einem Wert von 0,05, was einer MAF von annähernd 0,025 entspricht.
- (v) Der Marker lag nicht auf BTA4 und damit nicht auf dem Chromosom, auf welchem GEORGES et al. (1993) den Weaver-Locus kartiert hatte.

Nach Anwendung dieser Kriterien verblieben 1958 Marker im Markerset.

3.2.3.2 Haplotypisierung und Imputation

Unter einem Haplotypen versteht man die Abfolge von Allelen, welche sich auf ein und demselben Chromosom befinden und daher von demselben Elternteil stammen (BROWNING, 2008). Bei der sexuellen Fortpflanzung kommt es durch Verschmelzung von Eizelle und Spermium zu einer Kombination des maternalen und paternalen Haplotypen, dem Genotyp jedes Individuums (GELDERMANN, 2005). Die meisten Multilocus-Analysen zur Untersuchung von Assoziationen zwischen bestimmten Merkmalen und Markern im Genom benötigen diese Haplotypen als Ausgangspunkt (BROWNING & BROWNING, 2007), da sie gegenüber Einzelmarkern den

Vorteil bieten, dass auch die in LD mit flankierenden Markern enthaltenen Informationen miteinbezogen werden (AKEY et al., 2001). Um also zurückzuverfolgen, welche Allele vom Vater und welche Allele von der Mutter eines Tieres stammen, müssen die Genotypisierungsdaten, die nur die ungeordnete Gesamtheit an Allelen widerspiegeln, hinsichtlich ihrer Herkunft wieder aufgeschlüsselt werden. Dieser Vorgang nennt sich *Phasing* (BROWNING, 2008). Zu diesem Zweck wurde in unseren Analysen das Programm BEAGLE in der Version 3.0.4 (2009) eingesetzt.

Dieses Programm basiert auf einem *Hidden Markov Model* (BROWNING & BROWNING, 2007), welches aus den „beobachteten“ Daten den zugrundeliegenden „verborgenen“ Zustand ableiten kann (BROWNING, 2008). Bei dem verborgenen Zustand handelt es sich um die paternalen und maternalen Haplotypen, welche nicht ohne weiteres abgelesen werden können. Die nicht nach väterlicher und mütterlicher Herkunft der Allele sortierten Genotypen stellen die beobachteten Daten dar (BROWNING, 2008). Gleichzeitig ist BEAGLE in der Lage, die Allelkombinationen für Marker, welche nicht genotypisiert wurden, abzuleiten (BROWNING & BROWNING, 2009). Bei dieser sogenannten Imputation werden Genotypen benachbarter SNPs und Haplotypen-Frequenzen der Population herangezogen, um fehlende Genotypen abzuleiten (BROWNING & BROWNING, 2011).

Als Ausgangspunkt für die Berechnung des jeweils wahrscheinlichsten Haplotypen und das Auffüllen der aus der Genotypisierung stammenden Lücken werden die genotypisierten Individuen in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt: Eltern-Kind-Duos, Eltern-Kind-Trios und unverwandte Individuen. Dabei bieten die Trios auf Basis der Mendel'schen Vererbungslehre den Vorteil zusätzlicher Informationen im Hinblick auf die abzuleitenden Haplotypen (BROWNING & BROWNING, 2009).

Ein großer Vorteil des Programms selbst ist die leichte Anpassung an große Datensets (> 1000 Individuen) bei vergleichsweise kurzer Rechenzeit (BROWNING, 2008) und hoher Genauigkeit (BROWNING & BROWNING, 2009). Diese Genauigkeit lässt sich, vor allem hinsichtlich mit niedriger Frequenz auftretender Genvarianten, durch Vergrößerung des Referenzdatensatzes weiter steigern (BROWNING & BROWNING, 2009). Zu diesem Zweck wurden neben den 160 Tieren aus dem Kartierungs-Tiereset noch 8156 zusätzliche Tiere verschiedenster Rassen, welche in der weiteren

Kartierung nicht verwendet wurden, in die Haplotypisierung mit einbezogen. Diese insgesamt 8316 Tiere gliederten sich in 168 Trios, 3212 Duos und 5134 unverwandte Tiere. Die 43 in der Kartierung verwendeten Merkmals-träger waren in 22 Fällen Teil von Duos, für 21 Tiere lagen jedoch keine Genotypen der Eltern vor.

3.2.3.3 Korrektur auf Populationsstratifikation und Verwandtschafts-beziehungen

Wie in Kapitel 2.2.3.1.1 bereits beschrieben, haben diverse populationsgenetische Prozesse Einfluss auf die Entstehung von Kopplungsungleichgewicht. Im Falle von Populationsstratifikation tritt ein und dasselbe Allel in zwei Populationen verschiedener Abstammung mit unterschiedlicher Frequenz auf. Werden Individuen aus beiden Populationen nun für eine Assoziationsanalyse verwendet und der Frequenzunterschied dabei entdeckt, besteht die Gefahr, dass er fälschlicherweise auf einen Zusammenhang mit dem untersuchten Merkmal zurückgeführt wird, obwohl tatsächlich nur die unterschiedliche Abstammung der Populationen für die vorgefundenen Abweichungen verantwortlich ist (LIU et al., 2013). Am konkreten Beispiel des Braunviehs bedeutet dies, dass zum Beispiel für die Milchleistung, die bei Brown Swiss damals mehrere hundert kg über der Leistung des Braunviehs lag (FEWSON et al., 1975), falsch positive Assoziationen mit unbeteiligten chromosomalen Bereichen aus Brown Swiss hergestellt werden könnten. Die gleiche Gefahr besteht auch für Kartierungen von Krankheiten wie dem Weaver-Syndrom, die nur aus einer Teilpopulation einer stratifizierten synthetischen Population stammen.

Zusätzlich zu beachten sind unbekannte Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Tieren in der Testpopulation. Trägt einer der Vorfahren der Familie neben dem gesuchten Allel noch ein weiteres seltenes Allel, so tritt dieses seltene Allel bei den Nachkommen mit höherer Wahrscheinlichkeit auf als bei unverwandten Tieren aus der Population. Auch in diesem Fall kommt es zu falsch positiven Ergebnissen, wenn aus dem familiär bedingten Frequenzunterschied eine Assoziation mit dem Phänotyp abgeleitet wird (GODDARD & HAYES, 2009).

Bei Assoziationsanalysen bzw. genetischen Kartierungen ist daher also eine Korrektur auf Verwandtschaftsbeziehungen und Populationsstratifikation notwendig. Zu diesem Zweck wurden die genomweiten vereinheitlichten Verwandtschaftsbeziehungen (*unified additive relationships*, UAR) (POWELL et al., 2010) zwischen allen Tieren geschätzt. Zentrales Element dieser Methode ist die Wahrscheinlichkeit der Herkunftsgleichheit (*identity by descent*), kurz IBD. Bei zwei Allelen bzw. Haplotypen spricht man von IBD, wenn es sich bei ihnen um identische Kopien, welche von einem gemeinsamen Vorfahren stammen, handelt (POWELL et al., 2010; BROWNING & BROWNING, 2011). *Identity by state* (IBS) hingegen beschreibt das Vorliegen identischer Zustände unabhängig von einem gemeinsamen Vorfahren (POWELL et al., 2010). Die betrachteten Segmente stimmen also entweder überein, weil seit ihrem gemeinsamen Ursprung keine Rekombination stattgefunden hat und sie damit auch IBD sind, oder sie stammen von verschiedenen Vorfahren, sind aber trotzdem identisch (HAYES et al., 2003). Durch Berechnung der Wahrscheinlichkeiten zwischen allen Tieren, dass gleiche Allele aufgrund ihrer Herkunft von einem gemeinsamen Vorfahren übereinstimmen, d. h. IBD sind, wurde eine UAR-Matrix mit den Dimensionen 160 × 160 gebildet. Diese Verwandtschaftsmatrix basiert nicht nur auf den 1958 Markern des Chromosoms 4, sondern auf den 38 457 Markern des gesamten autosomalen Genoms, so dass letztendlich die genomweiten Verwandtschaftsbeziehungen in die Assoziationsanalyse bzw. Kartierung einbezogen werden.

3.2.3.4 Hauptkomponentenanalyse

Um auf Verwandtschaftsbeziehungen und Populationsstratifikation zu korrigieren und die Dimensionen der 160 × 160 UAR-Matrix ohne signifikanten Informationsverlust zu verkleinern, wurden im nächsten Schritt deren Hauptkomponenten bestimmt. Zu diesem Zweck wurde das Paket *paran* (DINNO, 2012) in R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013) eingesetzt, welches eine Implementierung der Parallelanalyse nach Horn darstellt. Die ersten 60 Hauptkomponenten, welche schließlich in das

gemischte lineare Modell in Kapitel 3.2.3.6 einfließen, erklärten mehr als 90 % der genetischen Varianz.

3.2.3.5 Bestimmung der Locus IBD und Diplotypen-Verwandtschaftsmatrix

Bei Haplotypen mit identischen Markerallelen, welche von einem gemeinsamen Vorfahren stammen und daher IBD sind, wird davon ausgegangen, dass sie mit großer Wahrscheinlichkeit auch dieselben nicht beobachteten genetischen Varianten tragen und damit weitestgehend in ihren Effekten auf das betrachtete Merkmal übereinstimmen (OLSEN et al., 2004). Durch die Nutzung der Beziehungen zwischen den Haplotypen in Form von IBD wird auch das in den Haplotypen enthaltene Kopplungsungleichgewicht in die abschließende Varianzkomponentenanalyse zur Ermittlung der Loci mit dem wahrscheinlichsten Einfluss auf den Phänotyp einbezogen.

Zur Bestimmung der Locus IBD (LocIBD) wurde die von MEUWISSEN und GODDARD (2007) vorgestellte Methode der IBD-Schätzung eingesetzt, welche auf eine große Anzahl eng positionierter Markerallele ausgelegt ist und zwischen Paaren von Markerhaplotypen die Wahrscheinlichkeit bestimmt, dass ein nicht beobachtetes Allel an einer beliebigen Position in beiden Haplotypen IBD ist. Dabei wurden Fenster von 40 SNP betrachtet, welche SNP für SNP über das Chromosom gleiten. In der Mitte jedes dieser Fenster, d. h. zwischen SNP 20 und 21, wurde dann basierend auf den flankierenden Markerhaplotypen die IBD-Wahrscheinlichkeit für den unbeobachteten Locus geschätzt. Da jedes Individuum einen maternalen und einen paternalen Haplotypen trägt (sog. Diplotyp), gibt es zwischen zwei Individuen jeweils vier Möglichkeiten, dass der betrachtete Locus IBD ist (LEE & VAN DER WERF, 2006). Zur Umwandlung der Haplotypen-LocIBD-Matrix, welche diese vier Wahrscheinlichkeiten beinhaltet, in eine Diplotypen-Verwandtschaftsmatrix (*diplotype relationship matrix*, \mathbf{D}_{RM}) kam die von LEE und VAN DER WERF (2006) für additive-genetische Verwandtschaftsmatrizen (*additive genetic relationship matrices*, \mathbf{G}_{RM}) vorgeschlagene Methode zum Einsatz. Dabei werden die vier IBD-

Wahrscheinlichkeiten aus den jeweiligen Diplotypenpaaren aufsummiert und durch 2,0 geteilt.

3.2.3.6 Varianzkomponentenanalyse

In die anschließende Varianzkomponentenanalyse flossen sowohl Informationen aus Kopplung als auch aus Kopplungsungleichgewicht ein: Kopplung wurde bei der Rekonstruktion der Haplotypen unter Einbezug der Pedigree-Daten berücksichtigt, während Kopplungsungleichgewicht bei der Schätzung der LocIBD Eingang fand. Diese kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungsanalyse (*cLDLA*) in Anlehnung an MEUWISSEN et al. (2002) schätzt für jeden der Mittelpunkte der 40-SNP Fenster, d. h. zwischen Marker 20 und 21, den Einfluss eines möglichen QTL auf den betrachteten Phänotyp. Zu diesem Zweck wurde das Programm ASREML (GILMOUR et al., 2009) eingesetzt, welches sämtliche Berechnungen der Varianzkomponentenanalyse auf Grundlage von folgendem gemischten linearen Modell durchführte:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{q} + \mathbf{e}$$

\mathbf{y} ist ein $n \times 1$ Vektor der Phänotypen des untersuchten Merkmals, in diesem Fall die drei möglichen Krankheitsstatus Merkmalsträger, Anlageträger und Weaver-frei. Um das untersuchte Merkmal als quantitatives Merkmal zu kartieren, wurden diese Status anhand des in Tabelle 4 skizzierten Schemas in Zahlenwerte umgewandelt.

Tabelle 4: Umwandlung der Krankheitsstatus in Zahlenwerte

| Zahlenwert | Krankheitsstatus des Tieres |
|------------|---|
| 1.0 | Weaver-frei |
| 2.0 | Anlageträger mit mindestens zwei Nachkommen mit bestätigter Weaver-Diagnose |
| 3.0 | Merkmalsträger mit vorliegendem pathologischem Untersuchungsbericht |

Für Merkmalsträger, für die aus den in Kapitel 3.1.2 genannten Gründen kein pathologischer Untersuchungsbericht verfügbar war, wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Zwischenwerte angenommen.

Tabelle 5: Zwischenwerte für Tiere ohne pathologischen Untersuchungsbericht

| Zahlenwert | Krankheitsstatus des Tieres |
|------------|--|
| 2.0 | laut Probennahmeprotokoll Merkmalsträger, keine Abstammungsdaten verfügbar |
| 2.25 | laut Probennahmeprotokoll Merkmalsträger, jedoch nur ein offizieller Anlageträger im Stammbaum |
| 2.5 | laut Probennahmeprotokoll Merkmalsträger, im Stammbaum jeweils ein offizieller Anlageträger auf mütterlicher und väterlicher Seite vorhanden, einer oder beide jedoch drei oder mehr Generationen entfernt |
| 2.75 | laut Probennahmeprotokoll Merkmalsträger, im Stammbaum jeweils ein offizieller Anlageträger auf mütterlicher und väterlicher Seite vorhanden, beide maximal zwei Generationen entfernt |

Diese Methode bietet den Vorteil, dass selbst Genotypisierungsdaten pathologisch nicht bestätigter Merkmalsträger in die Analysen einbezogen werden können. Sollte es sich bei einem dieser Tiere um einen falsch positiven Merkmalsträger, d. h. eine Phänokopie oder Fehldiagnose handeln, kommt es zwar zu einer Erniedrigung der Wahrscheinlichkeitskurve, die Region mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für die kausale Mutation bleibt aber trotzdem erkennbar.

β ist der Vektor der fixen Effekte und enthält den allgemeinen Mittelwert μ und die 60 Hauptkomponenten.

Bei Vektor \mathbf{q} handelt es sich um den Vektor der additiv-genetischen Effekte, während \mathbf{e} den Vektor der zufälligen Resteffekte darstellt. Für beide Vektoren wird angenommen, dass sie nicht miteinander korreliert sind und eine Normalverteilung mit Mittelwert 0 und Varianz $\mathbf{D}_{\mathbf{RMP}}\sigma_q^2$ bzw. $\mathbf{I}\sigma_e^2$ vorliegt. Es gilt also $\mathbf{q} \sim N(0, \mathbf{D}_{\mathbf{RMP}}\sigma_q^2)$ bzw. $\mathbf{e} \sim N(0, \mathbf{I}\sigma_e^2)$, wobei $\mathbf{D}_{\mathbf{RMP}}$ die Diplotypen-Verwandtschaftsmatrix an Position p des vermeintlichen QTL und \mathbf{I} eine Identitätsmatrix darstellt.

Bei **X** und **Z** handelt es sich um Designmatrizen, welche die beobachteten Werte mit den fixen und zufälligen QTL-Effekten verknüpfen.

3.2.3.7 Likelihood-Ratio Teststatistik

Die mit ASREML berechneten Wahrscheinlichkeiten für das Modell, welches einen QTL am Fenstermittelpunkt annimmt (Alternativhypothese, H1), und das Modell, welches einen QTL am Fenstermittelpunkt ausschließt (Nullhypothese, H0), wurden mithilfe einer Likelihood-Ratio Teststatistik (LRT) miteinander verglichen.

Der LRT-Wert berechnet sich anhand folgender Formel:

$$\text{LRT} = -2 \times (\log \text{likelihood (H0)} - \log \text{likelihood (H1)})$$

und folgt einer χ^2 -Verteilung mit einem Freiheitsgrad (HEUVEN et al., 2005). Die wahrscheinlichste Position des QTL befindet sich in dem Fenster, für welches der LRT-Wert und damit die Differenz der beiden Wahrscheinlichkeiten den maximalen Wert annimmt.

Um die mit einer Visual Basic Applikation ermittelten LRT-Werte grafisch darzustellen und anschließend auszuwerten, wurde MICROSOFT POWER POINT eingesetzt.

3.2.3.8 Festlegung der Signifikanzschwelle

Um hochsignifikante Ergebnisse zu erhalten, d. h. das Risiko falsch positiver Ergebnisse (Fehler 1. Art) möglichst gering zu halten, wurde ein konservativer P-Wert von 0,001 gewählt. Da in der angewendeten Analyse 1958 Fenster auf das Vorhandensein eines QTL getestet wurden, kam die Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtests (DEWAN et al., 2007) zum Einsatz, was zu einem korrigierten P-Wert von $< 5,11 \times 10^{-7}$ ($0,001/1958 = 5,11 \times 10^{-7}$) führte. Die entsprechende Signifikanzschwelle lag bei einem LRT-Wert von 25,223.

3.2.3.9 Bestimmung der Konfidenzintervalle

Für alle Maxima der LRT-Kurve, welche die Signifikanzschwelle von $LRT > 25,223$ überschritten, wurde zur Bestimmung der zugehörigen Konfidenzintervalle das 2-LOD (*logarithm of the odds*) Kriterium angewendet (VAN OOIJEN, 1992). Die Grenzen des jeweiligen Konfidenzintervalls, welches mit 95 % Wahrscheinlichkeit (VAN OOIJEN, 1992) die gesuchte Mutation enthält, errechnen sich dabei aus der Differenz zwischen dem LRT-Wert des Maximums und 9,21 (1 LOD entspricht einer LRT-Differenz von 4,605 (VISSCHER & GODDARD, 2004)).

Um sich einen Überblick über mögliche Kandidatengene zu verschaffen, wurden die ermittelten Konfidenzintervalle anschließend in *Ensembl* (CUNNINGHAM et al., 2015) mit einer Karte annotierter Gene verglichen.

3.2.4 Vergleichende Kartierung per Fall-Kontroll-Assoziationsanalyse

Parallel zur *cLDLA*-Kartierung wurde eine Homozygotie-Kartierung per Fall-Kontroll-Analyse durchgeführt, welche sich wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben auf Kopplungsungleichgewicht stützt, um Assoziationen zwischen chromosomalen Abschnitten und dem untersuchten Phänotyp zu ermitteln. Die Fallgruppe bildeten die 34 Merkmalsträger, die Kontrollgruppe die 85 Weaver-freien Tiere aus der *cLDLA*-Kartierung. Die ASSHOM-Methode, welche von CHARLIER et al. (2008) vorgestellt wurde, durchsucht in einem ersten Schritt das Genom der Fälle nach Aneinanderreihungen von homozygoten Markern. Anschließend wird für jedes Markerallel, für das Fall i homozygot ist, die Frequenz p_i in den Kontrollen geschätzt. Anhand dieser Frequenz enthält jeder Marker innerhalb des Homozygotiesegments einen Score, der die Summe von $-\log(p_i^2)$ über alle Marker widerspiegelt. Lange und seltene Haplotypen, die nur mit einer niedrigen Frequenz bzw. gar nicht in den Kontrollen auftreten, führen dabei zu einem hohen Score, während alle Marker, die heterozygot in Fall i auftreten, einheitlich mit einem niedrigen Score von 10^{-5} belegt werden. Abschließend werden für jede Markerposition die jeweiligen Scores aufsummiert. Je weniger häufig ein Markerallel heterozygot in den Fällen auftritt, desto höher der Summenscore und desto wahrscheinlicher die Assoziation mit dem betrachteten Phänotyp. Zur

Ermittlung der Signifikanz der einzelnen Summenscores werden sämtliche Marker entlang des Chromosoms permutiert und ein Summenscore als harmonisches Mittel über alle Fälle berechnet.

Die resultierende ASSHOM-Statistik wurde ebenfalls in MICROSOFT POWER POINT visualisiert und mit den Ergebnissen der *cLDLA* verglichen.

3.2.5 Ermittlung eines Weaver-Haplotypen auf BTA4

Zur Ermittlung eines gemeinsamen Weaver-Haplotypen, welcher in allen Merkmalsträgern homozygot bzw. in allen Anlageträgern heterozygot auftritt, wurden Genotypen von 32 bestätigten Anlageträgern und 13 direkten Nachkommen mit Weaver-Diagnose im Bereich um die beiden Maxima der *cLDLA*-Kartierung analysiert. Das Ergebnis wurde anschließend mit dem Homozygotiesegment aus Kapitel 3.2.4 verglichen.

3.2.6 Nutzung von Sequenzdaten aus dem 1000 Bull Genomes Project

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ruedi Fries und Dr. Hubert Pausch vom Lehrstuhl für Tierzucht der TU München wurden Sequenzdaten aus *Run4* des 1000 Bull Genomes Project (DAETWYLER et al., 2014) für die weitere Suche nach der kausalen Mutation herangezogen. Dieses 2012 gegründete internationale Projekt hat es sich zum Ziel gesetzt, aus den Sequenzdaten von Schlüsselstieren verschiedenster Rassen eine Datenbank aufzubauen, die es ermöglicht, Sequenzen von mit SNP-Chips genotypisierten Tieren zu imputieren. Diese Sequenzen können dann zur genomischen Zuchtwertschätzung oder zur Suche nach Mutationen herangezogen werden (HAYES et al., 2012; DAETWYLER et al., 2014).

Mit dem Datensatz des *Run4* standen die Sequenzdaten von 1147 Tieren aus 29 verschiedenen Rassen zur Verfügung. Unter den 59 verwendeten Braunvieh-Tieren befanden sich auch zwei bestätigte Anlageträger des Weaver-Syndroms: *TARGET*-BSWUSAM000000174360 und *MODERN*-BSWUSAM000000156458.

Um mögliche Kandidatenmutationen für das Weaver-Syndrom zu identifizieren, wurden die im *Run4*-Tieraset ermittelten Sequenzvarianten in

einem ersten Schritt nach ihrer Lokalisation innerhalb des Weaver-Homozygotiesegments (48 688 283 bp – 50 412 884 bp) gefiltert. Als mögliche Kandidatenmutationen kamen schließlich nur solche Varianten in Frage, die heterozygot in den beiden Weaver-Anlageträgern vorlagen, während alle anderen Tiere homozygot für das Referenzallel waren.

3.2.7 Überprüfung von Kandidatenmutationen durch gezielte Genotypisierungen

Um die ermittelten Kandidatenmutationen auf ihre Plausibilität hin zu überprüfen, wurden im hauseigenen Labor gezielte Genotypisierungen mithilfe der PCR-RFLP Methode (OTA et al., 2007) durchgeführt. Dieser Ansatz läuft nach folgendem Prinzip ab: Wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, erkennen und schneiden Restriktionsenzyme die DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen. Je nach Allel entstehen dabei Fragmente unterschiedlicher Länge, anhand derer der Genotyp des jeweiligen Individuums abgelesen werden kann. Um gezielt den Genotyp für einen SNP an einer bestimmten Position zu ermitteln, wird in der Datenbank REBASE® (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>, ROBERTS et al. (2015)) zunächst ein Restriktionsenzym ermittelt, das nur bei einem der beiden Allele des SNP seine Funktion ausführen kann. Im nächsten Schritt werden die für die Vervielfältigung des umgebenden DNA-Segments benötigten Primer anhand der bekannten DNA-Sequenz um den SNP designt. Nach dem Vervielfältigungsschritt per PCR und Einsatz des Restriktionsenzym werden die gewonnenen Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mithilfe von 2 %igem Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.2.7.1 Gezielte Genotypisierungen des SNP an Position 49 878 773 bp

Für die gezielte Genotypisierung des SNP an Position 49 878 773 bp auf BTA4 standen Proben von 63 Anlage- und 40 Merkmalsträgern mit geeigneter DNA-Qualität zur Verfügung. Als Restriktionsenzym wurde RsaI (LYNN et al., 1980) gewählt (Anh. 2). Dieses Enzym mit der

Erkennungssequenz GTAC schneidet bei Vorliegen des Referenzallels C, bei Vorliegen des alternativen Allels T bleibt die DNA intakt.

Eine zweite Schnittstelle des Enzyms innerhalb des von den Primern eingeschlossenen DNA-Segments lag unabhängig von dem Allel an Position 49 878 773 bp (Abb. 6) vor. Das daraus resultierende Fragment von 61 bp Länge konnte daher als Kontrolle für den ordnungsgemäßen Restriktionsverdau herangezogen werden.

Nach Auftrennung und Sichtbarmachen der Fragmente ergaben sich je nach Genotyp die in Tabelle 4 aufgeführten Bandenmuster.

```

49878573  AGCCACACAGTCAACTTACTTGATGGAGATCATTTCTTAACGCATATTCT
49878623  GCAAAGTAGCCCGGAGCAGCGGATGAGGCTCTGATGGCCTGCCACATTTT
49878673  ATACTGACAGCCTCCCAAATAGTGAGAGTTGATTCCAGGAAAATGTCCAT
49878723  AGTTCCTGAACACAAAGGCTTTTGGCGTTATCCCTCTGTTCACTATGGTA
49878773  CTTACTGCAGCGACCTAGTCGATTAAAAAGTGGACAATACGCATTGTAAG
49878823  CAGCAATATTTGGGACTGTAAAAATTAAATATTTAGTGGTATGAATGAAC
49878873  ATTGTTCAACTGTACCTATCAAGGTAAAGTGTATAACATAACCCTAATGT
49878923  TAAGCAAACAGAAGCAGATCCTTTTTAAACAGGTTTTGTTTTGTTTTTTTT

```

Abbildung 6: Erkennungssequenzen und verwendete Primer der PCR-RFLP für den SNP an Position 49 878 773 bp

Sequenz um den Kandidaten-SNP an Position 49 878 773 bp (rot markierte und unterstrichene Base „C“ Referenzallel). Rot markierte, unterstrichene Sequenzabschnitte stellen die verwendeten Primer dar, schwarz unterstrichene Sequenzabschnitte markieren die Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym *RsaI*.

Tabelle 4: Erwartete Restriktionsfragmente und entsprechende Genotypen bei der PCR-RFLP für den SNP an Position 49 878 773 bp

Länge der erwarteten Restriktionsfragmente und entsprechende Genotypen mit Referenzallel C und alternativem Allel T. Das als Kontrolle dienende 61-bp Fragment ist schwarz unterstrichen.

| Fragmente (in bp) | Genotyp |
|------------------------|---------|
| 114+ <u>61</u> +38 | CC |
| 152+114+ <u>61</u> +38 | CT |
| 152+ <u>61</u> | TT |

3.2.7.2 Gezielte Genotypisierungen des SNP an Position 50 858 538 bp

Ein zweiter SNP, welcher ebenfalls bei beiden Weaver-Anlageträgern heterozygot auftrat, während die restlichen Tiere homozygot für das Referenzallel waren, schied aufgrund seiner Position (50 858 538 bp) außerhalb des Homozygotiesegments (48 688 283 bp – 50 412 884 bp) eigentlich als Kandidatenmutation aus. Zur weiteren Bestätigung dieses Ausschlusses wurde ebenfalls eine gezielte Genotypisierung per PCR-RFLP durchgeführt.

Probenmaterial stand dabei für 16 Weaver-Merkmalsträger und 30 Anlageträger zur Verfügung. Als Restriktionsenzym konnte ebenfalls RsaI eingesetzt werden. Bei Vorliegen des alternativen Allels A wird die Erkennungssequenz GTAC erkannt und das Enzym kann schneiden (Abb. 7), während bei Vorliegen des Referenzallels G die DNA intakt bleibt (Anh. 3). In der Gelelektrophorese zeigten sich je nach Genotyp daher die in Tabelle 5 aufgeführten Bandenmuster:

```

50858338  GACAAGATGAAGAAGATGATCGAGCAGCTGAAAAAGGGAAATGACAGCAA
50858388  ACCGAGCCTCTCCCTCCCCCGGAAGACAAAAGATAGACGTTTGGTGTCCA
50858438  TATCTGTGGCAACAGAAGGCCCAATGACAAGATCTGTTGCGTGCCAGACA
50858488  GACCTAGTGGTGGAGACTGCTGAGCCCCCTGAAGAAGTTGCCTTTGAGCGT
50858538  GCCCGTAAAGCCTGCCACGGGGAGCCCCCTAGTCTCCGCCGGTGCCAAGG
50858588  GGAATGCCTGCCCCAGTGCCGCCTCGGTCAGACCGGGTATCGAGAGGCAG
50858638  GTTTCCCATGGTGACTTGATAGGCTCCTCTCTGCCCACTGTCCACCTCC
50858688  AAGTGCAAACAGAATTGAGGAAAATGGACCGAGCACCGGCTCAACACCAG
  
```

Abbildung 7: Erkennungssequenzen und verwendete Primer der PCR-RFLP für den SNP an Position 50 858 538 bp

Sequenz um den Kandidaten-SNP an Position 50 858 538 bp (rot unterstrichene und markierte Base „G“ Referenzallel). Rot markierte, unterstrichene Sequenzabschnitte stellen die verwendeten Primer dar, der schwarz unterstrichene Sequenzabschnitt markiert die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym RsaI.

Tabelle 5: Erwartete Restriktionsfragmente und entsprechende Genotypen bei der PCR-RFLP für den SNP an Position 50 858 538 bp

Länge der erwarteten Restriktionsfragmente und entsprechende Genotypen mit Referenzallel G und alternativem Allel A.

| Fragmente (in bp) | Genotyp |
|-------------------|---------|
| 300 | GG |
| 300+184+118 | GA |
| 184+118 | AA |

3.2.7.3 Überprüfung des Krankheitsstatus von Tieren mit abweichenden PCR-RFLP Genotypen

Für einen Teil der Tiere mit abweichenden RFLP-Genotypen konnten zur Überprüfung des Krankheitsstatus pathohistologische Schnittpräparate des Rückenmarks auf Ebene des Zervikal-, Thorakal- und Lumbalmarks sowie Schnitte des Hirnstammes aus dem Archiv des Instituts für Tierpathologie der LMU München herangezogen werden. Lagen zudem in Formalin fixierte Originalproben vor, wurden zusätzliche Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung neu angefertigt. Die abschließende Beurteilung erfolgte durch Prof. Dr. Kaspar Matiasek vom Institut für Tierpathologie der LMU München. Als zusätzliche Informationsquellen wurden Stammbäume, originale Probennahmeprotokolle und pathologische Untersuchungsberichte herangezogen.

Zur genaueren Schätzung der Frequenzen des Referenzallels und des alternativen Allels bei einem Tier mit Verdacht auf Blutchimärismus kam außerdem ein KASP-Ansatz zur Anwendung. Um Vergleichswerte zu erhalten, wurden dabei zusätzlich Proben von 63 Tieren (34 Merkmalsträger, 29 bestätigte Anlageträger), welche bereits mit dem PCR-RFLP Ansatz genotypisiert worden waren, und 43 weitere, bisher noch nicht genotypisierte Proben (5 Merkmalsträger, 38 Anlageträger), für den SNP an Position 49 878 773 bp untersucht. Der KASP™ Ansatz (*Kompetitive Allele Specific PCR*; LGC, Teddington, UK) bietet den Vorteil eines hohen Korrelationsgrades zwischen Allelfrequenz und Signalintensität (Korrelationskoeffizient $r = 0,9796 \pm 0,0094$) (CUENCA et al., 2013) und beruht auf folgendem Prinzip: Für jedes der beiden SNP-Allele wird ein

spezifischer *Forward*-Primer mit einer einzigartigen Schwanzsequenz hergestellt. In einer ersten PCR-Runde bindet der zum jeweils vorliegenden Allel passende Primer an die Test-DNA und amplifiziert die Ziel-Region. In der darauf folgenden PCR-Runde bindet ein *Reverse*-Primer an die generierte Sequenz und der entsprechende Gegenstrang wird synthetisiert. Sobald der Gegenstrang der angehängten Schwanzsequenz vorliegt, kann eine FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) Kassette binden, wodurch das vorliegende *Quenching* aufgehoben wird und Fluoreszenz detektiert werden kann. Anhand der beiden unterschiedlichen Farben im homozygoten Zustand bzw. der Mischfarbe bei Vorliegen beider Allele kann auf den Genotyp des jeweiligen Tieres am SNP zurückgeschlossen werden (LGC LIMITED, 2013).

3.2.8 Schätzung der Frequenz der Kandidatenmutation an Position 49 878 773 bp in einer Stichprobe von Braunvieh-Tieren aus der genomischen Evaluation

In Zusammenarbeit mit Dr. Hermann Schwarzenbacher von der ZuchtData GmbH/Rinderzucht Austria wurden Genotypen aus einem speziell entwickelten Custom Chip, welcher neben einer Vielzahl wichtiger Mutationen auch den Kandidaten-SNP an Position 49 878 773 bp abfragt, analysiert. Mit diesem Custom Chip wurden seit Januar 2014 insgesamt 14 531 Tiere der deutschen und österreichischen Rinderpopulation genotypisiert (persönliche Information Dr. Hermann Schwarzenbacher, Stand November 2015). Unter diesen Tieren, die aus den Geburtsjahrgängen 2013 bis 2015 stammen, befanden sich auch 2334 Braunvieh-Tiere. Die Genotypen dieser Tiere wurden auf das Vorkommen des Kandidaten-SNP überprüft und daraus die Frequenz der Mutation in der Stichprobe ermittelt.

3.2.9 Schätzung der Frequenz des Weaver-Haplotypen in anderen Rassen

In der von MCCLURE et al. (2013) untersuchten Holstein-Population trat der Weaver-Haplotyp mit einer Frequenz von 0,03 auf. Um zu überprüfen, ob

neben Brown Swiss und Braunvieh auch andere Rassen den in Kapitel 4.4 ermittelten gemeinsamen Haplotypen auf BTA4 tragen, wurden sämtliche Genotypen verschiedenster Rassen in der Datenbank des Lehrstuhls für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre analysiert. In Zusammenarbeit mit Dr. Franz Seefried von der Qualitas AG wurde zusätzlich die Datenbank der Schweizer Rinderpopulationen nach diesem Haplotypen durchsucht. Aus den dabei identifizierten heterozygoten Trägern des Haplotyps wurde anschließend die Frequenz für die jeweilige Rasse berechnet.

Zusätzlich wurden sechs Tiere (4 Fleckvieh, 1 Swiss Simmental, 1 Holstein), für die eine DNA-Probe mit geeigneter Qualität vorhanden war, mithilfe der PCR-RFLP für den Kandidaten-SNP an Position 49 878 773 bp genotypisiert.

3.2.10 Überprüfung des Krankheitsstatus des kontroversen Anlageträgers W0277

In den 1990er Jahren wurden in Zusammenarbeit mit verschiedenen Braunvieh-Zuchtorganisationen und dem Lehrstuhl für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre von der Tierzuchtforschung e.V. München erste Anstrengungen unternommen, um den genetischen Grundlagen des Weaver-Syndroms auf die Spur zu kommen. Unter allen Anlageträgern, die in diesem Zusammenhang per Mikrosatelliten-Test und Risikoanalyse identifiziert wurden, fiel ein Bulle aus dem Rahmen: W0277. Als Sohn eines bedeutenden Anlageträgers in Deutschland handelte es sich bei ihm mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % ebenfalls um einen Träger des Weaver-Allels. Die Vermutung schien durch die Ergebnisse des indirekten Gentests zur Gewissheit zu werden, welche den Bullen als Anlageträger einstufte. Bei einigen Züchtern bzw. Zuchtverbänden blieben jedoch leise Restzweifel bestehen, da bis zum Zeitpunkt des Gentests nur ein einziger am Weaver-Syndrom erkrankter Nachkomme (W0165) diagnostiziert worden war. Nach der Deklarierung als Anlageträger kamen noch zwei weitere Fälle in Form von einem direkten Nachkommen (W0364) und einer Enkelin (W0289) hinzu. Durch erfolgreichen Einsatz in der künstlichen Besamung waren aus W0277 jedoch über 11 400 Töchter in Milch (Bayerische Zuchtwert-Informationen BaZI Rind, <http://www.lfl-design3.bayern.de/itz/rind/bazi/index.php>, abgerufen

am 08.07.2015), fast ebenso viele Söhne und 14 nachkommergeprüfte Stiere (ZAR/ZuchtData Zuchtwertdatenbank, http://cgi.zar.at/cgi-bin/zw_default.pl, abgerufen am 08.07.2015) hervorgegangen, so dass statistisch gesehen eine viel höhere Anzahl an erkrankten Nachkommen zu erwarten gewesen wäre. Dass tatsächlich nur bei den drei oben genannten Tieren das Weaver-Syndrom diagnostiziert wurde, schien unter dem Gesichtspunkt der hohen Frequenz des Allels in der damaligen Population (HOESCHELE & MEINERT, 1990; LINDAUER & ESSL, 1994) ungewöhnlich.

Um den Anlageträgerstatus des Bullen zu überprüfen und diesbezügliche Zweifel endgültig auszuräumen, wurden W0277 und seine Nachkommen in einem gesonderten Ansatz genauer betrachtet. Der erste Schritt bestand dabei darin, den Weaver-Befund der betroffenen Nachkommen mithilfe von originalen bzw. neu angefertigten histopathologischen Schnittpräparaten abzusichern. Die Beurteilung und Diagnosestellung erfolgte auch in diesem Fall durch Prof. Dr. Kaspar Matiassek aus der neuropathologischen Abteilung des Instituts für Tierpathologie der LMU München.

Um Vergleiche auf genetischer Ebene anstellen zu können, wurden die mithilfe des Illumina BovineSNP50 BeadChip gewonnenen Genotypen von W0277, seinen drei Weaver-Nachkommen und deren nächsten Verwandten, sowie PCR-RFLP Genotypen für den Kandidaten-SNP an Position 49 878 773 bp herangezogen.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine Übersicht

Bevor auf einzelne Ergebnisse detailliert eingegangen wird, sollen die durchgeführten Analysen hier noch einmal kurz zusammengefasst werden: Um das dem Weaver-Syndrom zugrunde liegende Gen zu identifizieren und damit die Basis für einen eindeutigen diagnostischen Test zu schaffen, kamen zwei verschiedene Kartierungsansätze zum Einsatz. Der Schwerpunkt lag dabei auf der kombinierten Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungsanalyse (*cLDLA*), welche an die Methode von MEUWISSEN et al. (2002) angelehnt ist und sich auf eine Testpopulation von 31 Anlageträgern, 43 Merkmalsträgern und 86 Weaver-freien Tieren stützte. Zum Vergleich wurde eine Fall-Kontroll-Assoziationsanalyse nach der ASSHOM-Methode von CHARLIER et al. (2008) mit denselben 43 Merkmalsträgern (Fallgruppe) und 86 Weaver-freien Tieren (Kontrollgruppe) durchgeführt. Zur Ermittlung eines gemeinsamen Weaver-Haplotypen wurden zusätzlich die Haplotypen von 31 Anlage- und 13 Merkmalsträgern herangezogen. Auf Basis des dabei identifizierten Homozygotiesegments konnten Sequenzdaten aus *Run4* des *1000 Bull Genomes Project* nach möglichen Kandidatenmutationen durchsucht werden, welche anschließend per gezielter Genotypisierung auf ihre Plausibilität hin getestet wurden. Frequenzschätzungen des verbleibenden Kandidaten-SNP fanden in einer Gruppe von 2334 Braunvieh-Tieren aus der genomischen Selektion statt. Des Weiteren wurde eine Reihe verschiedenster anderer Rinderrassen auf das Vorkommen des Weaver-Haplotypen hin untersucht. Die Überprüfung des fraglichen Anlageträger-Status eines Weaver-Bullen wurde sowohl mithilfe von SNP-Chip und PCR-RFLP Genotypen als auch von pathohistologischen Gewebeschnitten durchgeführt.

4.2 Kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungs-Kartierung auf BTA4

Die LRT-Kurve erreichte ihr Maximum ($LRT = 73,9$) an Position 49 812 384 bp. Durch Anlage des 2-LOD Kriteriums konnte das zugehörige Konfidenzintervall, welches mit 95 % Wahrscheinlichkeit das kausale Gen enthält, zwischen den Positionen 49 514 652 bp und 50 367 484 bp ermittelt werden. Ein Vergleich dieses Intervalls mit der *Ensembl* Datenbank (CUNNINGHAM et al., 2015) ergab, dass folgende Gene innerhalb der genannten Grenzen liegen: *NRCAM*, *PNPLA8*, *NME8*, *SFRP4*, *EPDR1*, *STARD3NL*, die novel microRNA Gene *ENSBTAG00000045095* und *ENSBTAG00000044255* und die beiden uncharakterisierten Protein-codierenden Gene *ENSBTAG00000014795* und *ENSBTAG00000035945* (Abb. 8).

Von diesem Bereich nicht eingeschlossen war ein zweites Maximum ($LRT = 61,835$) an Position 47 598 264 bp. Auch hier wurde das 2-LOD Kriterium zur Ermittlung des Konfidenzintervalls zwischen den Markerpositionen 48 688 283 bp und 50 412 884 bp angewendet. Innerhalb dieses Bereiches befinden sich die Gene *CDHR3*, *SYPL1*, *NAMPT*, das microRNA Gen *ENSBTAG00000044548*, das U6 snRNA Gen *ENSBTAG00000042539* und das Pseudogen *ENSBTAG00000019824*.

4.3 Vergleichende Kartierung per Fall-Kontroll-Assoziationsanalyse

Die vergleichende Kartierung per Fall-Kontroll-Assoziationsanalyse über alle 29 Autosomen führte zu keinem signifikanten Ergebnis. Erst nach Ausschluss von vier Tieren (W0068, W0084, W0165, W0289), welche sich im Zuge der späteren Analysen als Phänokopien entpuppt hatten, konnte eine signifikante Assoziation des Weaver-Phänotyps mit einem Bereich zwischen den Markerpositionen 48 408 626 bp und 50 412 884 bp identifiziert werden (Abb. 9). Dieser Haplotyp von 1,913 Mb Länge trat homozygot in allen verbleibenden Tieren der Fallgruppe auf.

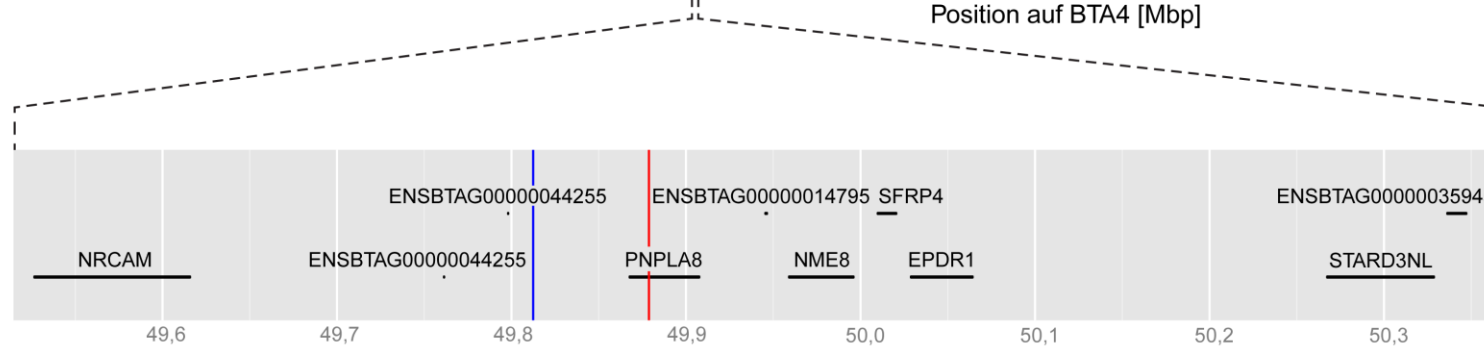
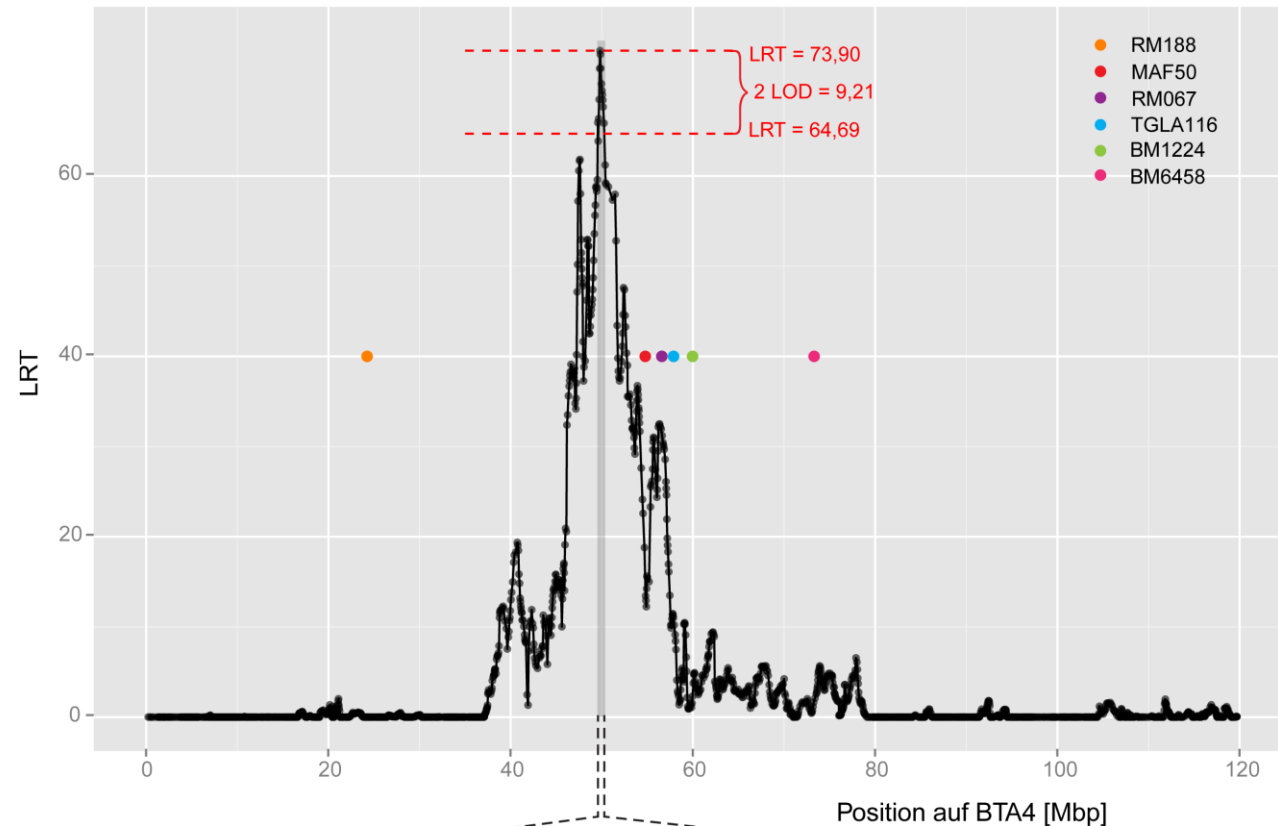


Abbildung 8: Vergleich des Konfidenzintervalls aus der *cLDLA* mit einer Liste annotierter Gene in *Ensembl*

Mithilfe der *cLDLA* ermittelte LRT-Kurve mit Maximum an Position 49 812 384 bp (LRT=73,9, blaue senkrechte Linie) unter Berücksichtigung der Lage im Vergleich zu den sechs Mikrosatelliten (RM188, MAF50, RM067, TGLA116, BM1224, BM6458) des indirekten Gentests (farbige Punkte, MEDJUGORAC et al. (1996)). Das durch Anwendung des 2-LOD Kriteriums ermittelte Konfidenzintervall (grauer Balken) zwischen den Markerpositionen 49 514 652 bp und 50 367 484 bp wurde mit einer Liste annotierter Gene in *Ensembl* (CUNNINGHAM et al., 2015) verglichen. Die rote senkrechte Linie durch *PNPLA8* markiert die Position des Kandidaten-SNP an Position 49 878 773 bp aus Sequenzvergleichen im Datensatz des 1000 *Bull Genomes Project* (DAETWYLER et al., 2014).

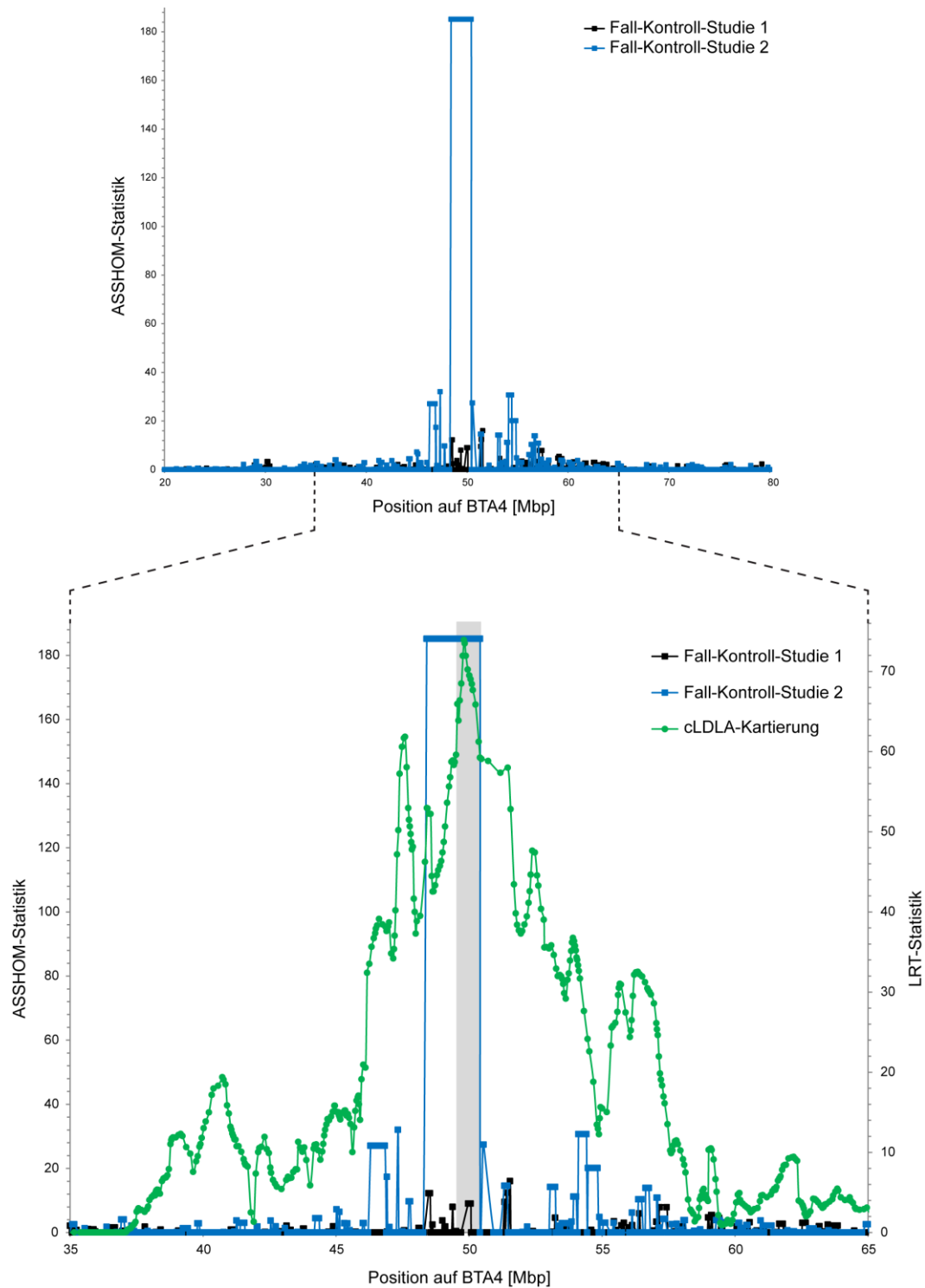


Abbildung 9: Vergleich der Ergebnisse der Homozygotie-Kartierungen mit und ohne Phänokopien mit den Ergebnissen der cLDLA (inkl. Phänokopien)

Der schwarze Graph mit schwarzen Quadraten zeigt die Ergebnisse der Fall-Kontroll-Studie 1, für welche die 34 Merkmalsträger und die 85 Weaver-freien Tiere aus der cLDLA die Fall- bzw. Kontrollgruppe bildeten. In der Fall-Kontroll-Studie 2, deren Ergebnisse im blauen Graphen mit blauen Quadraten dargestellt sind, wurden vier Phänokopien aus der Fallgruppe entfernt, so dass nun ein signifikant mit dem Weaver-Phänotyp assoziierter Bereich ermittelt werden konnte. Zum Vergleich wird die LRT-Kurve der cLDLA (grüner Graph mit grünen Punkten) dargestellt, deren Maximum sich innerhalb des Weaver-assoziierten Bereichs aus der Fall-Kontroll-Studie 2 befindet.

4.4 Identifizierung eines gemeinsamen Haplotypen auf BTA4

Das in Kapitel 4.3 identifizierte Homozygotiesegment war deckungsgleich mit den Ergebnissen des manuellen Haplotypenvergleichs von 13 Weaver-Merkmalsträgern. Unter Hinzunahme der Haplotypen von 32 Anlageträgern konnte ein gemeinsamer Haplotyp, welcher heterozygot in allen Anlageträgern und homozygot in allen Merkmalsträgern auftrat und sich über 37 SNPs zwischen den Markerpositionen 48 688 283 bp und 50 412 884 bp erstreckte, ermittelt werden. Von den beiden mit der *cLDLA* Methode kartierten Maxima war nur das Maximum an Position 49 812 384 bp in diesem Bereich eingeschlossen, das zweite Maximum und sein Konfidenzintervall (47 343 868 bp – 47 750 208 bp) lagen deutlich außerhalb (Anh. 4).

4.5 Nutzung von Sequenzdaten aus dem 1000 Bull Genomes Project

22 610 Sequenzvarianten innerhalb des in Kapitel 4.4 eingeeengten Homozygotiesegments (48 688 283 bp – 50 412 884 bp) wurden danach gefiltert, ob sie heterozygot in zwei bekannten Weaver-Anlageträgern auftraten, während alle anderen Tiere homozygot für das Referenzallel waren. Ein einziger SNP an Position 49 878 773 bp (rs800397662) erfüllte diese Kriterien (Anh. 5). Der C → T Basenaustausch ist im codierenden Bereich des Gens *PNPLA8* lokalisiert und bewirkt einen Aminosäurenaustausch (Serin → Asparagin) im zugehörigen Genprodukt, der *calcium-independent phospholipase A2-gamma* (iPLA_{2γ}) (Abb. 10). Mit einem SIFT-Score (NG & HENIKOFF, 2003) von 0,01 und einem Polyphen2-Score (ADZHUBEI et al., 2010) von 1,00 wirkt sich diese Mutation mit hoher Wahrscheinlichkeit stark beeinträchtigend auf die Proteinfunktion aus. Der Vergleich der Proteinsequenzen verschiedener Eukaryoten zeigt, dass sich an Position 568 ein hochkonserviertes Serin befindet (Abb. 11), das möglicherweise für die korrekte Funktion des Proteins notwendig ist.

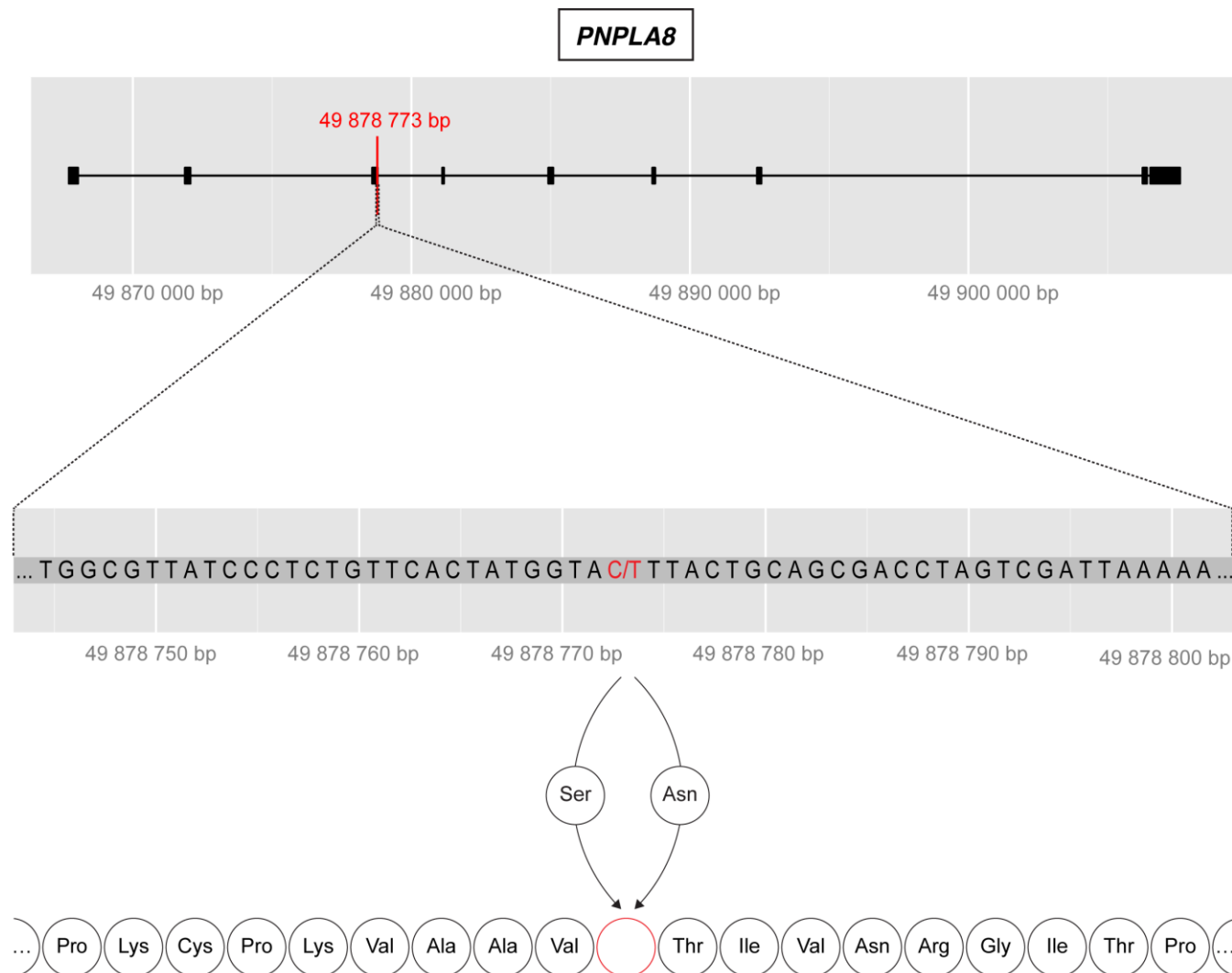


Abbildung 10: Position, Struktur und Auswirkungen des Kandidaten-SNP an Position 49 878 773 bp

Darstellung der Position des in Vergleich von Sequenzdaten des *1000 Bull Genomes Project* (DAETWYLER et al., 2014) ermittelten Kandidaten-SNP an Position 49 878 773 bp im Gen *PNPLA8* (Exons: breiter schwarzer Balken, Introns: schmaler schwarzer Balken). Bei Vorliegen des Referenzallels C wird die Aminosäure Serin in die Aminosäuresequenz des Proteinprodukts eingebaut, bei Vorliegen des alternativen Allels T die Aminosäure Asparagin (nicht-synonymer SNP).

| <u>Spezies</u> | | <u>Sequenz</u> | |
|-------------------------------------|-----|--|-----|
| H. sapiens (Mensch) | 550 | MIETARNPTCPKVAAV S TIVNRGITPKAFVFRNYGHFPGINSHYLGGCQY | 599 |
| P. troglodytes (Schimpanse) | 550 | MIETARNPTCPKVAAV S TIVNRGITPKAFVFRNYGHFPGINSHYLGGCQY | 599 |
| M. mulatta (Rhesusaffe) | 550 | MIETARNPTCPKVAAV S TIVNRGITPKAFVFRNYGHFPGNNSHYLGGCQY | 599 |
| C. lupus familiaris (Haushund) | 552 | MIETARNPSCPKVAAV S TIVNRGITPKAFVFRNYGHFPGINSHYLGGCQY | 601 |
| B. taurus (Hausrind) | 552 | MIETARNPKCPKVAAV S TIVNRGITPKAFVFRNYGHFPGINSHYLGGCQY | 601 |
| M. musculus (Maus) | 544 | MIETARNPACPKVAAI S TIVNRGQTPKAFVFRNYGHFPGTNSHYLGGCQY | 593 |
| R. norvegicus (Ratte) | 544 | MIETARDPLCPKVAAV S TIVNRGQTPKAFVFRNYGHFPGTNSHYLGGCQY | 593 |
| G. gallus (Huhn) | 571 | MIETARNSKCPKVAAV S TIVNRGTPLKAFVFRNYNHFPGVKSHYIGGCQY | 620 |
| D. rerio (Zebrafisch) | 463 | MVETSKNPNC PKVSAV S TVVNRGLPLKAYVFRNYNFLPGVRSHYLGSCQH | 512 |
| A. gambiae (Anopheles-Mücke) | 200 | IIDTVMLPNVPKFCCI S TTVCDEY-IDAHVFRNYTFPQNVQSVYAGSHTA | 248 |
| C. elegans (Fadenwurm) | 316 | MINTSRKLHTPRLAIV S SIVNLPT-IQPYIFRNYDHPAGRDSHYRGGADH | 364 |
| X. tropicalis (Trop. Krallenfrosch) | 544 | MVETARNPLCPKVS AV S TIVNRGMPLKAFVFRNYNHFPGIKSPYMGGCQY | 593 |

Abbildung 11: Vergleiche der Proteinsequenz von iPLA_{2γ} zwischen verschiedenen Spezies

Vergleiche der Proteinsequenz von iPLA_{2γ} im Bereich um das hochkonservierte Serin an Position 568 (rot markiert). Grau markiert ist die Referenzsequenz für das Hausrind (*B. taurus*). (NCBI HomoloGene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>, abgerufen am 25.08.2015)

Ein weiterer SNP an Position 50 858 538 bp (rs442854880), welcher ebenfalls perfekt mit dem Anlageträgerstatus der zwei Bullen assoziiert war, während alle anderen sequenzierten Tiere homozygot für das Referenzallel waren, lag außerhalb der Grenzen des 1,72-Mb Homozygotiesegments.

4.6 Gezielte Genotypisierungen für zwei Kandidaten-SNPs per PCR-RFLP

Um den im Vergleich mit Sequenzdaten aus dem *1000 Bull Genomes Project* ermittelten SNP an Position 49 878 773 bp als Kandidatenmutation zu bestätigen, wurde für 63 Anlage- und 40 Merkmalsträger der Genotyp an diesem SNP bestimmt. Die Ergebnisse des PCR-RFLP Ansatzes stimmten weitgehend mit den Genotypen überein, die im Falle einer Assoziation mit dem Weaver-Syndrom zu erwarten waren. Bei fünf Tieren jedoch traten Konflikte zwischen dem Krankheitsstatus und dem ermittelten Genotyp auf. Drei Tiere mit der Diagnose Weaver-Syndrom waren heterozygot, während ein weiterer Merkmalsträger und ein Anlageträger homozygot für das Referenzallel waren (Tab. 6).

Tabelle 6: Konflikte zwischen angenommenem Krankheitsstatus und Ergebnissen der gezielten Genotypisierungen

Nach Labornummern (TierLID) geordnete Tiere mit Widersprüchen zwischen angenommenem Krankheitsstatus (AT: Anlageträger, MT: Merkmalsträger, MS-Test: Mikrosatelliten-Test zur Weaver-Diagnose) und den Ergebnissen der gezielten Genotypisierungen (SNP 49 878 773 bp: Referenzallel C, alternatives Allel T; SNP 50 858 538 bp: Referenzallel G, alternatives Allel A).

| TierLID | Klinische/Genetische Diagnose (1990er Jahre) | Genotyp an Position | |
|---------|---|---------------------|---------------|
| | | 49 878 773 bp | 50 858 538 bp |
| W0037 | AT | CT | AA |
| W0045 | MT | CT | GA |
| W0068 | MT | CT | GA |
| W0084 | MT | CC | GG |
| W0125 | MT | CT | AA |
| W0226 | AT (MS-Test) | CC | GG |
| W0246 | MT | TT | GA |

Die gleiche Prozedur wurde für den SNP an Position 50 858 538 bp mit Proben von 30 Anlageträgern und 16 Merkmalsträgern durchgeführt. Auch hier stimmte bei einigen Tieren der ermittelte Genotyp nicht mit dem angenommenen Krankheitsstatus überein (Tab. 6). Der Anlageträger W0037 war homozygot für das alternative Allel (AA), während der bestätigte Merkmalsträger W0246 einen heterozygoten Genotyp (GA) aufwies.

4.6.1 Überprüfung widersprüchlicher Ergebnisse bezüglich des SNP an Position 49 878 773 bp

Um Genaueres über die Tiere mit widersprüchlichen Genotypisierungsergebnissen in Erfahrung zu bringen, wurden deren Abstammungsdaten sowie Probennahmeprotokolle und pathologische Untersuchungsberichte überprüft. Pathohistologische Schnitte bzw. in Formalin fixierte Gewebeproben waren für die drei Tiere W0068, W0084 und W0125 nicht vorhanden, so dass sich die erneute Beurteilung rein auf die schriftlichen Aufzeichnungen stützte. Dabei fiel auf, dass der Krankheitsstatus der Tiere bereits zum Zeitpunkt der Diagnose zweifelhaft gewesen war, da in allen drei Fällen auf einer bzw. beiden Seiten des Stammbaumes kein Weaver-Anlageträger verzeichnet war. Eine Erkrankung am Weaver-Syndrom war daher allein aus den Abstammungsdaten nicht sicher ableitbar.

Für Tier W0226 war zu Beginn der hier durchgeführten Analysen angenommen worden, dass der Anlageträgerstatus auf erkrankten Nachkommen beruhte. Wie sich herausstellte, war der Krankheitsstatus tatsächlich aber nur auf die Ergebnisse des Mikrosatellitentests und der anschließenden Risikoanalyse zurückzuführen. Unter seinen knapp 1000 Nachkommen (Bayerische Zuchtwert-Informationen BaZI Rind, <http://www.lfl-design3.bayern.de/itz/rind/bazi/index.php>, abgerufen am 08.07.2015) fand sich kein einziger Fall von diagnostiziertem Weaver-Syndrom, so dass auch hier möglicherweise eine Fehldiagnose vorlag.

Ein Vergleich der Haplotypen von W0068, W0084 und W0226 mit dem in Kapitel 4.4 identifizierten Weaver-Haplotypen führte zu folgenden Ergebnissen: Tier W0068 war in Übereinstimmung mit seinem heterozygoten Genotyp ebenfalls heterozygot für den gemeinsamen Haplotypen. W0084

und W0226, die homozygot für das Referenzallel waren, wiesen auch den gemeinsamen Haplotypen nicht auf (Tab. 7). Für W0125 waren keine Genotypen verfügbar, so dass nicht auf Übereinstimmungen mit dem gemeinsamen Haplotypen untersucht werden konnte.

Tabelle 7: Vergleich der Haplotypen der Tiere mit abweichenden PCR-RFLP Genotypen mit dem gemeinsamen Weaver-Haplotypen

Nach Labornummern (TierLID) geordnete Tiere mit Konflikten zwischen angenommenem Krankheitsstatus und den Ergebnissen der gezielten Genotypisierung für den SNP an Position 49 878 773 bp (C: Referenzallel, T: alternatives Allel) per PCR-RFLP. Die jeweiligen Haplotypen sind nach ihrer Herkunft (Phase; M: maternal, P: paternal) aufgetrennt. Der gemeinsame Weaver-Haplotyp ist rot markiert.

| TierLID | PCR-RFLP | Phase | Haplotyp |
|---------|----------|-------|---|
| W0045 | CT | M | AAAGGGGAAAAGGAAGAAGGCAGCGAGGGGCAAAAGAA |
| | | P | AAAGGGGAAAAGGAAGAAGGCAGCGAGGGGCAAAAGAA |
| W0068 | CT | M | GGCAGGGAGAGGAAGAAGGCAGCGAAAGGAGAAAAGAA |
| | | P | AAAGGGGAAAAGGAAGAAGGCAGCGAGGGGCAAAAGAA |
| W0084 | CC | M | AAAGGAAAAAAGGAAGAAGGCAGCGAAGGGAGAAAAGAA |
| | | P | GGCAGGGAAAAAGAAGAAAGCAGCAGAGAGCACCGGAA |
| W0226 | CC | M | AAAGGAAAAAAGGAAGAAGGCAGCGAAGGGAGAAAAGAA |
| | | P | AAAGGGGAGAGGAAGGGAACGGAAAGGGGCAAAAGCA |

Eine besondere Situation lag bezüglich Tier W0045 vor. In Formalin eingebettete Rückenmarksproben waren im Archiv des Instituts für Tierpathologie der LMU eingelagert, so dass für eine Überprüfung des Krankheitsstatus histopathologische Schnitte angefertigt werden konnten. Die Beurteilung dieser Schnitte führte zu folgendem Ergebnis: Im thorakalen Segment des Rückenmarks fanden sich deutliche Veränderungen, welche am stärksten in den ventralen und lateralen Bahnen ausgeprägt waren. Die Art und das Verteilungsmuster dieser Veränderungen sprachen für das Vorliegen des Weaver-Syndroms und bestätigten damit die ursprüngliche Diagnose. Ein Vergleich der Genotypisierungsdaten von W0045 mit dem gemeinsamen Haplotypen auf BTA4 zeigte zudem, dass das Tier homozygot für den Weaver-Haplotypen war. Die PCR-RFLP für den SNP an Position 49 878 773 bp ergab jedoch einen heterozygoten Genotyp (CT), welcher im Widerspruch zu der eindeutigen Weaver-Diagnose stand. Bei der Überprüfung der Abstammungsdaten von W0045 fiel auf, dass das Tier aus

einer Zwillingsgravidität hervorgegangen war, so dass nun Blutchimärismus als mögliche Ursache für den abweichenden Befund in den Fokus rückte. Chimärismus beschreibt das parallele Vorhandensein von Zelllinien mit zwei verschiedenen Genotypen in einem Organismus (ANDERSON et al., 1951). Dieses Phänomen wird bei Rinderzwillingen häufig beobachtet. Durch im Uterus ausgebildete Anastomosen zwischen den Blutgefäßsystemen der Föten findet ein gegenseitiger Austausch von Blut statt (LILLIE, 1916). Hämatopoetische Stammzellen können auf diese Weise von einem Zwilling zum anderen wandern und sich neben den körpereigenen Vorläuferzellen in den blutbildenden Geweben des Körpers einnisten, so dass ein Leben lang zwei verschiedene Blutzelllinien produziert werden (OWEN, 1945; NIKU et al., 2007). Der Anteil der Zellen von jedem Genotyp ist innerhalb der Individuen eines Zwillingspaares ungefähr gleich, variiert jedoch zwischen verschiedenen Zwillingspaaren und kann daher nicht verallgemeinert werden (BASRUR & KANAGAWA, 1969). Bei der Genotypisierung solcher Blutchimären fallen reduzierte Qualitätsparameter wie z. B. niedrige *Call-Rates* und *GenCall Scores* auf (GURGUL et al., 2014). DNA von W0045 wurde mit dem Illumina BovineSNP50 v2 BeadChip zwei Mal genotypisiert. Beide Male war die *Call-Rate* mit 0,95 und 0,96 relativ niedrig. Um zu bestimmen, in welchem Verhältnis Referenzallel und alternatives Allel in der untersuchten Probe von W0045 auftraten, wurde der in Kapitel 3.2.7.3 beschriebene KASP Ansatz eingesetzt. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt: Bei allen 39 Anlageträgern wiesen Referenzallel und alternatives Allel ungefähr die gleiche Signalintensität auf (C: 4478,84, T: 4654,28). Bei der untersuchten Probe von W0045 war die Signalintensität für das Referenzallel C mit einem Wert von 2605,50 deutlich niedriger als die Intensität für das alternative Allel T mit einem Wert von 6412,00, was ebenfalls für das Vorliegen von Chimärismus spricht.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es sich bei den Tieren mit Widersprüchen zwischen angenommenem Krankheitsstatus und ermitteltem Genotyp an Position 49 878 773 bp mit relativ großer Wahrscheinlichkeit um falsch positive Weaver-Fälle, sogenannte Phänokopien, handelte. Der auf dem indirekten Mikrosatelliten-Test beruhende Anlageträgerstatus von Tier W0226 ist ohne Nachkommen mit bestätigter Weaver-Diagnose ebenfalls

anzuzweifeln. Im Fall von W0045 lassen sich die abweichenden Ergebnisse durch das Phänomen des Blutchimärismus erklären.

4.6.2 Überprüfung widersprüchlicher Ergebnisse bezüglich des SNP an Position 50 858 538 bp

Bei der gezielten Genotypisierung von 30 Anlageträgern und 16 Merkmals-trägern traten in zwei Fällen Ergebnisse auf, welche nicht mit dem angenommenen Krankheitsstatus vereinbar waren. Da weder für W0037 noch für W0246 pathohistologische Schnitte bzw. konserviertes Gewebe vorlagen, musste auch hier auf schriftliche Aufzeichnungen zurückgegriffen werden.

Den Abstammungsdaten nach handelte es sich bei W0037 um die Mutter des pathologisch bestätigten Weaver-Falles W0035. Da erste Symptome des Weaver-Syndroms mit 5–8 Monaten (STUART & LEIPOLD, 1983b), d. h. vor Erreichen der Geschlechtsreife, auftreten und auf Basis der Aufzeichnungen auch ein Embryotransfer ausgeschlossen werden konnte, blieb der Konflikt zwischen dem bestätigten Anlageträgerstatus und dem homozygoten Genotyp für das alternative Allel (AA) bestehen.

Der Merkmalsträgerstatus von W0246 wurde ebenfalls durch das pathologische Untersuchungsergebnis bestätigt, so dass auch hier keine Erklärung für den heterozygoten Genotyp (GA) gefunden werden konnte.

Zusammenfassend ließen sich also in beiden Fällen die Widersprüche zwischen Krankheitsstatus und PCR-RFLP Genotyp nicht auflösen, so dass der SNP an Position 50 858 538 bp letztendlich als Kandidatenmutation ausgeschlossen wurde. Dieser Ausschluss anhand der abweichenden Genotypen bestätigte noch einmal den positionellen Ausschluss durch die Ergebnisse der Homozygotie-Kartierung (48 688 283 bp – 50 412 884 bp).

4.7 Schätzung der Frequenz der Kandidaten-Mutation in einer Stichprobe von Braunvieh-Tieren aus der genomischen Evaluation

Die Auswertung der Genotypisierungsdaten von 2334 Braunvieh-Tieren aus

den Geburtenjahrgängen 2013 bis 2015, welche mit dem Custom Chip gewonnen worden waren, ergab eine Frequenz von 0,26 % für das alternative Allel des Kandidaten-SNP an Position 49 878 773 bp (Tab. 8). In 12 197 Tieren anderer Rassen trat die Mutation nicht auf.

Tabelle 8: Ermittlung der Frequenz der Kandidaten-Mutation in einer Stichprobe aus den Geburtenjahrgängen 2013 bis 2015

| Jahr | Genotypisiert | Heterozygot | Allelfrequenz [%] |
|-------|---------------|-------------|-------------------|
| 2013 | 122 | 2 | 0,82 |
| 2014 | 834 | 3 | 0,18 |
| 2015 | 1378 | 7 | 0,25 |
| Summe | 2334 | 12 | 0,26 |

4.8 Schätzung der Haplotypenfrequenz und Überprüfung der Kandidatenmutation in anderen Rassen

Ein Screening der Genotypen verschiedenster Rassen für den gemeinsamen Haplotypen auf BTA4 identifizierte insgesamt 29 Tiere, die heterozygot für den Haplotypen waren. Eine gezielte Genotypisierung von sechs Tieren (4 Fleckvieh, 1 Swiss Simmental, 1 Holstein) für den SNP an Position 49 878 773 bp ergab, dass jedes dieser Tiere homozygot für das Referenzallel und damit weder potentieller Anlage- noch Merkmalsträger des Weaver-Syndroms war (Tab. 9).

Tabelle 9: Ergebnisse der gezielten Genotypisierungen von heterozygoten Trägern des Weaver-Haplotypen aus anderen Rassen für den SNP Chr4:49 878 773 bp

Nach Labornummern (TierLID) geordnete Tiere der Rassen Fleckvieh und Swiss Simmental (FV) sowie Holstein (HF) mit zugehörigem Genotyp (SNP 49 878 773 bp: Referenzallel C, alternatives Allel T).

| TierLID | Genotyp an SNP 49 878 773 bp |
|---------|------------------------------|
| FV0125 | CC |
| FV0163 | CC |
| FV1031 | CC |
| FV1446 | CC |
| FV1447 | CC |
| HF0954 | CC |

4.9 Überprüfung des Anlageträgerstatus von Tier W0277

Im PCR-RFLP Ansatz für den Kandidaten-SNP an Position 49 878 773 bp ergaben sich sowohl für W0277 als auch für seine Nachkommen und deren Mütter Widersprüche, da alle Tiere entgegen ihres angenommenen Krankheitsstatus homozygot für das Referenzallel (CC) waren. Die einzige Ausnahme bildete Tier W0303, bei dem der heterozygote Genotyp (CT) seinem Status als Anlageträger entsprach. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer zusätzlich durchgeführten PCR-RFLP für den SNP an Position 50 858 538 bp erzielt. Die ermittelten Genotypen sprachen hier ebenfalls gegen eine Assoziation des SNP mit dem angenommenen Krankheitsstatus (Tab. 10).

Tabelle 10: Ergebnisse der gezielten Genotypisierungen für die beiden Kandidaten-SNPs der W0277-Familie

Nach Labornummern (TierLID) geordnete Mitglieder der Familie des kontroversen Anlageträgers W0277 mit ursprünglich diagnostiziertem und Neubewertetem Krankheitsstatus (AT: Anlageträger, MT: Merkmalsträger, frei) sowie den zugehörigen Genotypen aus den gezielten Genotypisierungen per PCR-RFLP (SNP 49 878 773 bp: Referenzallel C, alternatives Allel T; SNP 50 858 538 bp: Referenzallel G, alternatives Allel A). Gedankenstriche symbolisieren mangels Probenmaterials nicht durchgeführte Untersuchungen pathohistologischer Schnitte bzw. Genotypisierungen.

| TierLID | Diagnostizierter Krankheitsstatus | | Genotyp an Position | |
|---------|-----------------------------------|------|---------------------|---------------|
| | 1990er Jahre | 2015 | 49 878 773 bp | 50 858 538 bp |
| W0277 | AT | – | CC | GG |
| W0165 | MT | frei | CC | GA |
| W0166 | AT | – | CC | – |
| W0364 | MT | frei | CC | GG |
| W0365 | AT | – | CC | GG |
| W0289 | MT | frei | CC | – |
| W0287 | AT | – | CC | – |
| W0303 | AT | – | CT | GG |

Vergleiche mit dem in Kapitel 4.4 identifizierten Weaver-Haplotypen führten dementsprechend zu keinen Übereinstimmungen in den per SNP-Chip genotypisierten Mitgliedern der Familie (Abb. 12).

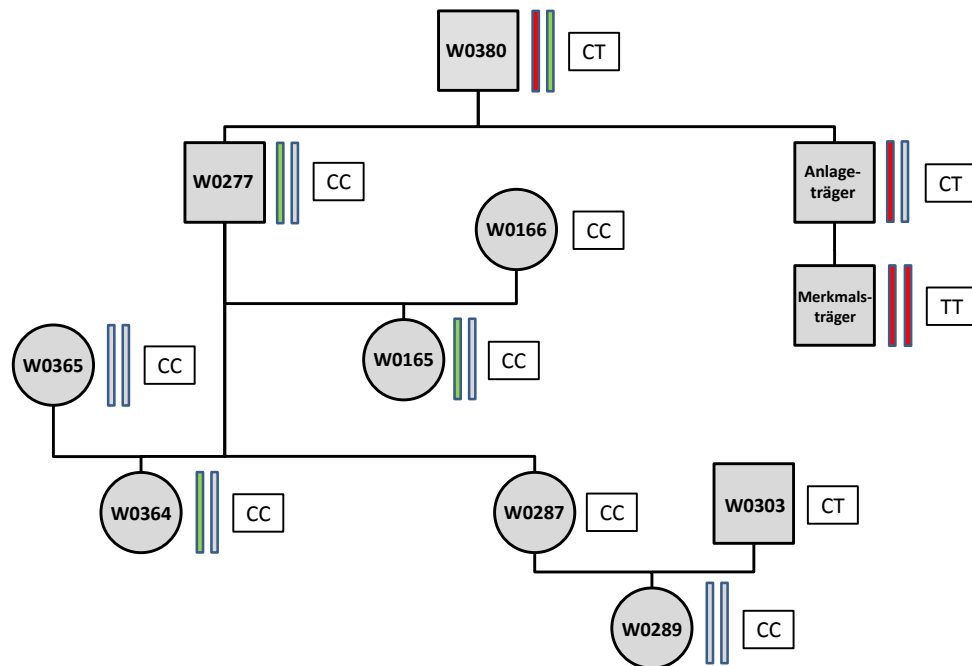


Abbildung 12: Genotypen und Haplotypen im Pedigree der W0277-Familie

Rote Balken symbolisieren den gemeinsamen Weaver-Haplotypen zwischen den Markerpositionen 48 688 283 bp und 50 412 884 bp, der in Anlage-trägern heterozygot und in Merkmalsträgern homozygot auftrat. Grüne Balken stellen den Haplotypen dar, der von W0380 über W0277 an dessen Nachkommen weitergegeben wurde. Graue Balken symbolisieren alle Haplotypen, die nicht von W0380 stammen und auch nicht mit dem Weaver-Haplotypen übereinstimmen. Für Tiere ohne Angabe der Haplotypen lagen keine Genotypisierungsdaten vor. Die jeweiligen Genotypen für den SNP an Position 49 878 773 bp sind in den Rechtecken auf der rechten Seite des jeweiligen Tiers/Haplotypen angegeben (C: Referenzallel, T: alternatives Allel).

Um die Korrektheit der in den 1990er Jahren vergebenen Phänotypen zu überprüfen, wurden pathohistologische Schnitte von Hirnstamm und Rückenmark von allen drei Nachkommen neu beurteilt.

Für Tier W0165 konnten aufgrund mangelnden Materials keine neuen Schnitte angefertigt werden, die Beurteilung des Krankheitsstatus erfolgte in diesem Fall anhand der originalen Schnitte aus dem Jahr 1991. Veränderungen fanden sich hier lediglich im dorsalen Strang des

Rückenmarks. Für das Weaver-Syndrom typische Läsionen treten an dieser Lokalisation, welche für die Weiterleitung sensorischer Informationen zuständig ist (ANGEL, 1977), normalerweise nur in sehr geringem Ausmaß auf, sondern konzentrieren sich auf die ventralen und lateralen Funiculi (STUART & LEIPOLD, 1985). Eine Erkrankung am Weaver-Syndrom wurde für dieses Tier daher weitestgehend ausgeschlossen.

Bei Tier W0364 waren Faserdegenerationen in der weißen Substanz nur in sehr geringem Ausmaß feststellbar. Stattdessen zeigten sich Veränderungen im Rückenmarksgrau, die auf ein infarktöses Geschehen als Ursache hinter der neurologischen Symptomatik hindeuteten. Dieser Verdacht wurde durch die neu angefertigten Schnitte bestätigt, in welchen ödematöse Veränderungen der grauen Substanz im thorakalen Bereich erkennbar waren. Das Vorliegen des Weaver-Syndroms konnte auch in diesem Fall weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung der Schnitte von Tier W0289 führte zu folgenden Ergebnissen: In den thorakalen und lumbalen Segmenten waren ventral und lateral Veränderungen der weißen Substanz zu erkennen, zudem wies die Meninx entzündliche Veränderungen auf. Diese Befunde wurden möglicherweise durch ein Wirbelsäulentrauma oder eine kompressive Myelopathie hervorgerufen. In den neu angefertigten Schnitten zeigten sich Veränderungen betont dorsal und nicht über die gesamte Länge des Rückenmarks verteilt, was für eine fokale segmentale Schädigung des Thorakalmarks in Folge eines Traumas als wahrscheinlichste Ursache sprach.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die neurologische Symptomatik bei allen drei Tieren mit relativ großer Wahrscheinlichkeit nicht auf das Weaver-Syndrom zurückzuführen war und auch hier stattdessen von Phänokopien auszugehen ist. Ein gemeinsames Muster bezüglich der Art und Verteilung der Veränderungen bzw. Läsionen konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden.

Um zu überprüfen, ob dennoch eine genetische Komponente eine Rolle bei der auffälligen familiären Häufung der Phänokopien spielt, wurde ein genomweites Homozygotie-Mapping mit den drei Nachkommen von W0277 als Testgruppe und einer Kontrollgruppe aus 46 Weaver-freien und 34 Original Braunvieh-Tieren durchgeführt. Auf diese Weise konnten drei relativ

kurze Haplotypen, für welche die drei Nachkommen von W0277 homozygot waren, identifiziert werden (Tab. 11). Für jeden dieser Bereiche wurden anschließend Sequenzdaten von W0277 mit denen seines Vaters W0380 verglichen, um mögliche genetische Varianten mit dem Potential, eine Erbkrankheit auszulösen, aufzuspüren. In keinem dieser Chromosomenabschnitte konnten jedoch solche schwerwiegenden Mutationen festgestellt werden.

Tabelle 11: Positionen der in den Weaver-verdächtigen Nachkommen von W0277 ermittelten Homozygotiesegmente

Auflistung der ermittelten Haplotypen nach ihrer Position auf dem jeweiligen Chromosom (Chr) und mit Start- bzw. Endposition.

| Chr | Startposition (bp) | Endposition (bp) | Haplotyp |
|-----|--------------------|------------------|----------|
| 01 | 139 231 307 | 139 409 122 | GAAAAG |
| 05 | 10 560 048 | 10 788 597 | GCGAG |
| 16 | 62 134 743 | 62 361 331 | GAGAG |

5 Diskussion

5.1 Vor- und Nachteile des Probenmaterials

Zu Beginn der Diskussion soll noch einmal hervorgehoben werden, dass es sich bei den in dieser Studie verwendeten Blut-, DNA- und Gewebeproben um rund 20 Jahre altes Material handelte. Im Gegensatz zu der Studie von MCCLURE et al. (2013), die gänzlich ohne Weaver-Merkmalsträger auskommen musste, konnten auf diese Weise neben Anlageträgern und Weaver-freien Tieren auch am Weaver-Syndrom erkrankte Tiere in die Analysen einbezogen werden. Die Möglichkeit, originale Gewebeschnitte von Rückenmark und Hirnstamm noch einmal zu analysieren bzw. zum Teil sogar neue Schnitte anzufertigen, erleichterte die Überprüfung des Krankheitsstatus einiger Tiere mit abweichenden Genotypisierungsergebnissen. Zusätzlich konnten auf diese Weise falsch positive Weaver-Fälle im Tierstammbaum, sogenannte Phänokopien, aufgedeckt werden, welche möglicherweise dazu beigetragen hatten, dass frühere Kartierungsversuche am Lehrstuhl für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre ohne Erfolg geblieben waren.

Gleichzeitig machte es der große zeitliche Abstand zur Probennahme jedoch auch relativ schwer, die beobachteten Symptome, darauf basierende Diagnosen und etwaige menschliche Fehler im weiteren Umgang mit den Proben noch nachzuvollziehen. Hier musste auf schriftliche Aufzeichnungen aus den 1990er Jahren wie z. B. Probennahmeprotokolle, pathologische Untersuchungsberichte und Stammbäume zurückgegriffen werden. Die Kontrolle der Abstammung war in fraglichen Fällen per Genotypisierung mit dem Mikrosatelliten-Abstammungsset durch die Tierzuchtforschung e.V. München in Grub (GENECONTROL GmbH), Überprüfung der IBD-Werte und Vergleiche von Haplotypen möglich.

5.2 Vergleich der Kartierungsmethoden

Mithilfe der kombinierten Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungsanalyse (*cLDLA*-Methode) konnte ein maximaler LRT-Wert an Position 49 812 384 bp auf BTA4 kartiert werden. Das zugehörige Konfidenzintervall, welches mithilfe

des 2-LOD Kriteriums festgelegt wurde, erstreckte sich über einen Bereich zwischen den Markerpositionen 49 514 652 bp und 50 367 484 bp.

Im Vergleich mit den Ergebnissen einer parallel durchgeführten Fall-Kontroll-Studie werden die Vorteile der *cLDLA*-Methode offensichtlich. Die Homozygotie-Kartierung unter Einsatz der ASSHOM-Methode (CHARLIER et al., 2008) mit den 43 Merkmalsträgern und 86 Weaver-freien Tieren aus der Testpopulation der *cLDLA* als Fall- bzw. Kontrollgruppe führte zwar zu einem indikativen Signal (Maximum 16,0299) an Position 51 544 780 bp auf BTA4, ein signifikant mit dem Weaver-Syndrom assoziierter Chromosomenabschnitt konnte jedoch nicht ermittelt werden. Erst nachdem vier Tiere (W0068, W0084, W0165, W0289), welche den Ergebnissen der hier durchgeführten Analysen nach als Phänokopien eingestuft werden müssen, aus der Fallgruppe entfernt wurden und mit diesem veränderten Tierset eine erneute Kartierung durchgeführt wurde, konnte eine signifikante Assoziation (185,1288) des Bereichs zwischen den Markerpositionen 48 408 626 bp und 50 412 884 bp mit dem Weaver-Phänotyp beobachtet werden.

Fall-Kontroll-Studien sind demnach stark von der korrekten Bestimmung der Phänotypen abhängig. Ein falsch positives Tier in Form einer Phänokopie reicht bereits aus, um die Kartierung soweit zu stören, dass signifikante Ergebnisse ausbleiben bzw. Assoziationen mit unbeteiligten chromosomalen Bereichen auftreten. Da die Phänokopien jedoch nicht immer von Anfang an ersichtlich sind, sondern wie in diesem Beispiel erst im Laufe von Folgeanalysen erkannt werden, ist der alleinige Einsatz einer Fall-Kontroll-Kartierung nur bei absoluter Sicherheit bezüglich der Phänotypen anzuraten. Im Gegensatz dazu bietet die *cLDLA*-Methode den Vorteil, dass Phänokopien ausschließlich zu einer Verringerung des LRT-Wertes führen ohne dabei die Position der Maxima zu beeinflussen, so dass die gesuchten Loci dennoch kartiert werden können. Dieser Sachverhalt wird im Vergleich der Kartierungsergebnisse mit der Position der kausalen Mutation (Abb. 9) deutlich. Trotz der Präsenz der Phänokopien und eines falsch deklarierten Anlageträgers in der Kartierungspopulation kartiert die *cLDLA*-Methode den Weaver-Locus mit maximaler Wahrscheinlichkeit an Position 49 812 384 bp und damit nur 66 kb von der tatsächlichen Position der kausalen Mutation (49 878 773 bp) entfernt. Des Weiteren liegt die kausale Mutation relativ

zentral in dem im Zuge der *cLDLA* ermittelten Konfidenzintervall zwischen den Markerpositionen 49 514 652 bp und 50 367 484 bp (Abb. 8).

Ein weiterer Vorteil der *cLDLA*-Methode besteht darin, dass neben Weaver-freien Tieren und Merkmalsträgern auch Anlageträger in die Analyse einbezogen werden können. Anlageträger für bestimmte Erbkrankheiten werden nicht in jedem Fall aus der Zucht ausgeschlossen, da die wirtschaftlichen Vorteile bei hohen Zuchtwerten überwiegen (CHARLIER et al., 2008) und das Risiko von erkrankten Nachkommen durch Zuchtmanagement und Vermeidung von Träger-Anpaarungen kontrolliert werden kann (COLE, 2015). Probenmaterial von Anlageträgern in Form von Sperma ist daher länderübergreifend und mit relativ geringem Aufwand erhältlich und kann in der *cLDLA* wertvolle zusätzliche Informationen liefern.

Ein dritter Vorteil der *cLDLA*-Methode im Vergleich mit der Fall-Kontroll-Studie ist ihre höhere Kartierungsgenauigkeit. Mithilfe des 2-LOD Kriteriums wurde ein 0,85-Mb Bereich zwischen den Markerpositionen 49 514 652 bp und 50 367 484 bp eingegrenzt, welcher mit 95 % Wahrscheinlichkeit die kausale Mutation enthält. Das mithilfe der Fall-Kontroll-Studie ermittelte Intervall zwischen den Markerpositionen 48 408 626 bp und 50 412 884 bp erstreckt sich über 2 Mb und ist damit mehr als doppelt so groß. Eine feinere Eingrenzung des Bereichs um die kausale Mutation ist ohne zusätzliche informative Rekombinationen hier nicht möglich.

5.3 Ermittlung von Kandidatengen und Kandidaten-SNPs

Neben dem Maximum an Position 49 812 384 bp (LRT = 73,9) auf BTA4 wurde ein zweites Maximum (LRT = 61,835) an Position 47 598 264 bp kartiert. Der Unterschied zwischen den LRT-Werten der beiden Maxima betrug 12,065, was einer Differenz von 2,6 LOD-Scores entspricht. Da eine Differenz von 1 LOD-Score einer zehnfach geringeren Wahrscheinlichkeit gleichzusetzen ist (VAN OOIJEN, 1992), enthält das Konfidenzintervall des zweiten Maximums (47 393 560 bp - 47 717 512 bp) mit rund 400-fach geringerer Wahrscheinlichkeit die gesuchte Mutation als das Konfidenzintervall des Haupt-Maximums (49 514 652 bp – 50 367 484 bp). Ein weiteres Ausschlusskriterium lieferte der durch eine Fall-Kontroll-

Kartierung und Haplotypenvergleiche ermittelte gemeinsame Weaver-Haplotyp (48 688 283 bp – 50 412 884 bp), welcher mit den Ergebnissen von MCCLURE et al. (2013) auf gesamter Länge überlappte und das Hauptmaximum an Position 49 812 384 bp mit zugehörigem Konfidenzintervall einschloss, das zweite Maximum jedoch nicht.

Zur Ermittlung möglicher Kandidatengene für das Weaver-Syndrom wurden daher nur Gene mit Positionen zwischen 49 514 652 bp und 50 367 484 bp (CI Hauptmaximum) betrachtet. Aufgrund ihrer Funktionen rückten besonders *NRCAM* (*neuronal cell adhesion molecule*) und *PNPLA8* (*patatin-like phospholipase domain containing 8*), die auch bereits in der Studie von MCCLURE et al. (2013) als zwei der wahrscheinlichsten Kandidatengene diskutiert worden waren, in den Fokus. *NRCAM* wird hauptsächlich in sich entwickelnden neuronalen Geweben exprimiert (HORTSCH, 2000) und spielt mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle in Neuritenwachstum (SAKURAI et al., 1997) und Bildung der Ranvier-Schnürringe (SUTER et al., 1995; FEINBERG et al., 2010). Zudem nehmen seine Genprodukte richtungsweisende Funktionen für Kommissuralfasern (FITZLI et al., 2000) und propriozeptive Fasern (PERRIN et al., 2001) wahr. Da *NRCAM* (49 526 574 bp – 49 615 802 bp) jedoch weiter von der Position des maximalen LRT-Wertes (49 812 384 bp) entfernt liegt als *PNPLA8* (49 867 702 bp – 49 907 595 bp) und zudem keinen der beiden Kandidaten-SNPs aus den Vergleichen der Sequenzdaten des *1000 Bull Genomes Project* beinhaltetete, konnte das Gen als möglicher Kandidat ausgeschlossen werden.

PNPLA8 hingegen umfasste in seinem codierenden Bereich den nicht-synonymen SNP an Position 49 878 773 bp und kam daher weiterhin als Kandidatengen in Frage. Ein zweiter, synonymer SNP, für den die beiden Weaver-Anlageträger im *1000 Bull Genomes Project* ebenfalls einen heterozygoten Genotyp aufwiesen, während alle anderen Tiere homozygot für das Referenzallel waren, lag an Position 50 858 538 bp im Gen *CTTNBP2*. Beide Sequenzvarianten befanden sich zudem unter den 41 von MCCLURE et al. (2013) identifizierten Kandidaten-SNPs im Bereich zwischen 48 und 53 Mb. Zur Überprüfung ihrer Assoziation mit dem Weaver-Syndrom wurden mithilfe der PCR-RFLP Methode gezielte Genotypisierungen von

Anlage- und Merkmalsträgern durchgeführt. Dabei traten in beiden Ansätzen Fälle von Widersprüchen zwischen Krankheitsstatus und Genotyp auf.

Für den SNP an Position 50 858 538 bp ließen sich diese Widersprüche auch nach Überprüfung von Abstammungsdaten, pathologischen Befunden und Genotypen nicht ausräumen. Der Anlageträger W0037 mit bestätigtem Weaver-Nachkommen, der homozygot für das alternative Allel war, sowie ein Merkmalsträger (W0246) mit pathologischer Diagnose und heterozygotem Genotyp sprachen gegen eine Assoziation des SNP mit dem Weaver-Syndrom, so dass auch diese Mutation als möglicher Kandidat ausgeschlossen wurde.

Im Falle des SNP an Position 49 878 773 bp konnten die bei fünf Tieren auftretenden Konflikte zwischen Genotyp und Krankheitsstatus durch Auswertung von Datenmaterial bzw. histopathologische Untersuchungen geklärt werden. Bei den drei Tieren W0068, W0084 und W0125 ist aufgrund fehlender Anlageträger im Pedigree von falsch positiven Weaver-Fällen, sogenannten Phänokopien, auszugehen. Ebenfalls erst im Nachhinein wurde festgestellt, dass der Anlageträgerstatus von Tier W0226 nicht auf nachweislich erkrankten Nachkommen beruhte, sondern ausschließlich durch den Mikrosatelliten-Test festgestellt worden war. Dieses Tier war homozygot für das Referenzallel und wies keine bestätigten Erkrankungsfälle unter seinen knapp 1000 Nachkommen (Bayerische Zuchtwert-Informationen BaZI Rind, <http://www.lfl-design3.bayern.de/itz/rind/bazi/index.php>, abgerufen am 08.07. 2015; BrunaNet Braunvieh Schweiz, <http://www2.braunvieh.ch/ArgusB/>, abgerufen am 15.06.2015) auf, so dass auch hier von einer falschen Einstufung des Krankheitsstatus auszugehen ist. Der abweichende heterozygote Genotyp des Zwillingstiers W0045 mit histopathologisch bestätigter Weaver-Diagnose konnte wiederum durch das Vorliegen von Blutchimärismus plausibel erklärt werden.

Für den SNP an Position 49 878 773 bp als wahrscheinlichste Kandidatenmutation sprach ebenfalls das in Kapitel 4.4 ermittelte Homozygotiesegment zwischen 48 688 283 bp und 50 412 884 bp, dessen Grenzen den SNP an Position 50 858 538 bp deutlich ausschlossen. Weitere Argumente für diese Hypothese ergaben sich aus der genaueren Betrachtung der Funktionen des von der Mutation betroffenen Gens. *PNPLA8* (*patatin-like phospholipase domain containing 8*) codiert für die Calcium-unabhängige Phospholipase A_{2γ}

(iPLA_{2γ}) aus der Familie der A2 Phospholipasen. Hauptfunktion dieser Enzyme ist die Katalyse der hydrolytischen Spaltung von Esterbindungen an der sn-2 Position von Membranphosphoglyceriden. Dabei werden Fettsäuren und Lysophospholipide freigesetzt, die entweder selbst biologisch aktiv sind oder aber zu verschiedenen biologisch aktiven Substanzen und Signalmolekülen verstoffwechselt werden können (KUDO & MURAKAMI, 2002). Ein wichtiges Reaktionsprodukt ist beispielsweise die Arachidonsäure, die einerseits zur Verfolgung der Enzymaktivität herangezogen werden kann (MURAKAMI et al., 2005) und gleichzeitig den Ausgangspunkt für die Produktion von Eicosanoiden (SMITH et al., 2000) bildet. Eicosanoide und Lysolipide spielen wiederum eine wichtige Rolle in bioenergetischen Mechanismen und Signalprozessen in Mitochondrien (MOON et al., 2012) bzw. im Fall von Eicosanoiden im Neuritenwachstum, der Modulation von Ionenkanälen, Proteinkinasen und sogar der Gentranskription (FAROOQUI et al., 1997).

iPLA_{2γ} selbst wird hauptsächlich in Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Retikulum und Peroxisomen exprimiert (YODA et al., 2010). In vitro Studien mit unterdrückter Phospholipaseaktivität zeigten eine erhöhte Rate von Lipidperoxidationen und Apoptose, woraus eine kritische Rolle des Enzyms im Schutz von Zellen gegen oxidativen Stress bzw. anschließenden Reparaturprozessen abgeleitet wurde (KINSEY et al., 2008). Auch in *Knock-out* Mäusen konnten eine verringerte Synthese von Lipid-Botenstoffen und erhöhte Level an Lipidperoxidation nachgewiesen werden (YODA et al., 2010). Gleichzeitig war die Mitochondrienzahl verringert (YODA et al., 2010) bzw. die Mitochondrienfunktion gestört, was sich in verzögertem Wachstum, reduzierter körperlicher Belastungsfähigkeit (MANCUSO et al., 2007; YODA et al., 2010) sowie Muskelatrophie und -schwäche (YODA et al., 2010), d. h. einem insgesamt bioenergetisch defizitären Phänotyp (MANCUSO et al., 2007), äußerte.

Überschneidungen mit dem Phänotyp der *Knock-Out* Mäuse wurden auch beim Menschen in einem Fall von komplexer Heterozygotie (*compound heterozygosity*) für zwei *Frameshift*-Mutationen in *PNPLA8* beobachtet (SAUNDERS et al., 2015). Der betroffene Patient war bei Geburt symptomlos, entwickelte aber innerhalb der ersten Lebensjahre progressive Muskelschwäche, Gangabnormalitäten, Spasmen und Anfälle. Durch

Analysen von Muskelbiopsien konnte ein Mangel an iPLA_{2γ} und damit ein Ausfall des korrekt gebildeten Enzyms als Folge der Mutationen nachgewiesen werden. In der Muskulatur fanden sich zusätzlich subsarkolemmale Ansammlungen von Mitochondrien mit ungeordnet verlaufenden Cristae und kugelförmigen osmiophilen Einschlusskörperchen. Eine Laktatazidose und erhöhte Anionenlücke in der Blutuntersuchung wiesen auf eine mitochondriale Dysfunktion hin, während die Laborwerte ansonsten weitgehend unauffällig waren. Aus den Parallelen zu den Symptomen der *Knock-Out* Mäuse wurde auf eine Verbindung zwischen dem Phänotyp des Patienten, der auf eine Mitochondriopathie hindeutete, und den Mutationen in *PNPLA8* geschlossen (SAUNDERS et al., 2015).

Diese Annahme lässt sich auch auf das Weaver-Syndrom übertragen, bei dem folgende Übereinstimmungen zwischen den beobachteten Symptomen und dem humanen bzw. *Knock-Out* Phänotyp auftreten: Merkmalsträger werden ebenfalls symptomlos geboren und entwickeln innerhalb des ersten Lebensjahres eine progressive Hinterhandschwäche mit Gangabnormalitäten bis hin zum völligen Verlust der Geh- und Stehfähigkeit (LEIPOLD et al., 1973). Ansammlungen von veränderten Mitochondrien finden sich sowohl in der Muskulatur (BAIRD et al., 1988) als auch in Schwann-Zellen und den Axonen selbst (OYSTER et al., 1992b). Damit einher gehen erhöhte Werte des mitochondrialen Enzyms Glutamatdehydrogenase (GLDH) im Liquor sowie der auf sekundäre Muskelschädigungen hinweisenden Enzyme Creatinkinase (CK), Aspartat-Aminotransferase (AST) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) (DOLL et al., 1993). Das restliche Blutbild ist wie bei dem humanen Patienten weitgehend unauffällig (BRAUN et al., 1987).

Zusammenfassend kann daher angenommen werden, dass es sich bei dem SNP an Position 49 878 773 bp in *PNPLA8* mit großer Wahrscheinlichkeit um die kausale Mutation hinter dem Weaver-Syndrom handelt. Diese Theorie wird durch sämtliche Ergebnisse der hier durchgeführten Analysen, welche sich weitgehend mit den Erkenntnissen von MCCLURE et al. (2013) decken, gestützt. Alternative Kandidatengene bzw. -mutationen konnten aufgrund von unauflösbaren Widersprüchen eindeutig ausgeschlossen werden.

5.4 Überprüfung des Krankheitsstatus eines kontroversen Anlageträgers

Unter der Annahme des SNP an Position 49 878 773 bp als kausale Mutation wurde anschließend der Status eines fraglichen Anlageträgers überprüft. Zu diesem Zweck wurden pathohistologische Schnitte von drei seiner Nachkommen, welche als Merkmalsträger eingestuft, jedoch homozygot für das Referenzallel waren, untersucht. Die dabei beobachteten Veränderungen des Rückenmarks sprachen in allen drei Fällen gegen eine Erkrankung am Weaver-Syndrom, so dass auch hier von falsch positiven Diagnosen aufgrund von Phänokopien auszugehen war. Da es sich bei den Tieren jedoch um Nachkommen desselben Bullen, d. h. Tiere mit engem Verwandtschaftsverhältnis, handelte, musste in Betracht gezogen werden, dass den drei Phänokopien entweder (i) eine genetische Ursache zugrunde lag, indem die Symptome durch eine gemeinsame, vom Weaver-Syndrom unabhängige Mutation verursacht wurden, oder (ii) die Genetik keine Rolle spielte und die Symptome stattdessen durch organische bzw. traumatische Veränderungen bedingt waren. Beiden Fällen ist gemeinsam, dass bezüglich des Anlageträgerstatus von W0277 ebenfalls von einer falsch positiven Diagnose durch den Mikrosatelliten-Test auszugehen ist, welche durch die Phänokopien zusätzlich scheinbar „bestätigt“ wurde.

Die Ergebnisse der pathohistologischen Untersuchung, in welcher kein gemeinsames Muster hinsichtlich der Art und Lokalisation der Veränderungen ausgemacht werden konnte, sprachen einheitlich gegen die Hypothese eines genetischen Auslösers. Mit hoher Wahrscheinlichkeit lagen den Symptomen stattdessen traumainduzierte bzw. infarktiös bedingte Läsionen zugrunde. Durch den in den 1990er Jahren relativ hohen Druck, dem Auftreten neuer Erkrankungsfälle durch Identifikation und Zuchtausschluss sämtlicher Anlageträger entgegenzuwirken, ist anzunehmen, dass sich unter den diagnostizierten Merkmalsträgern auch einige falsch positive Weaver-Fälle befanden. BRAUN et al. beschrieben 2003 vier Fälle von Braunvieh-Rindern mit progressiver Ataxie und Parese, die zum Teil große Ähnlichkeit mit der Weaver-Symptomatik aufwiesen, letztendlich aber durch Abszesse in der Halswirbelsäule bedingt waren.

Zusätzliche Argumente gegen einen genetischen Auslöser lieferte ein anschließendes Homozygotie-Mapping der drei vermeintlichen Weaver-Nachkommen gegen eine Kontrollgruppe aus gesunden Individuen, in welchem nur drei relativ kurze Haplotypen mit einer maximalen Länge von sechs SNPs identifiziert werden konnten. Beim Vergleich von Sequenzdaten beinhaltet keines dieser Intervalle eine schwerwiegende Mutation mit dem Potenzial, die beobachteten Symptome auszulösen.

5.5 Rolle der Mutation in der genetisch aktiven Braunvieh-/Brown Swiss-Population sowie in anderen Rassen

Unter 2334 Braunvieh-Tieren aus den Geburtsjahrgängen 2013 bis 2015 konnten mit einem speziell entwickelten Custom Chip 12 Tiere mit einem heterozygoten Genotyp für den SNP an Position 49 878 773 bp identifiziert werden (Stand November 2015). Dies entspricht einer Frequenz von 0,26 % und liegt damit zehnfach unter der angenommenen Frequenz von 2,6 % in den USA (VANRADEN et al., 2011) bzw. 3,5 % in Österreich (MANATRINON et al., 2009), zeigt aber gleichzeitig, dass die Mutation in der heutigen Braunviehpopulation noch immer vorhanden ist. Aufgrund der relativ niedrigen Frequenz ist die Wahrscheinlichkeit einer Anlageträger-Anlageträger-Verpaarung und damit des Auftretens von neuen Erkrankungsfällen mit ca. einem Fall pro 605 000 Tieren relativ gering, ein Populationsmonitoring für den SNP mithilfe des Custom Chips sollte aber dennoch nicht unterbleiben. Seit 1997 wurden zwar keine offiziellen Fälle mehr gemeldet, allerdings könnte diese Tatsache auch auf eine Abnahme der Meldedisziplin mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur Hauptphase der Weaver-Ausbrüche in den 1990er Jahren zurückzuführen sein. Zu bedenken bleibt in diesem Zusammenhang ebenfalls, dass die Sensitivität von Züchtern und Landwirten gegenüber bestimmten Erkrankungen stets eng mit der Häufigkeit ihres Auftretens gekoppelt ist. Da das Weaver-Syndrom aufgrund der erfolgreichen Anwendung von indirektem Gentest bzw. Zuchtausschluss von Anlageträgern einiges an Aktualität eingebüßt hat, dürfte diese Erkrankung im Zusammenhang mit Ataxie und Parese mittlerweile bei vielen Züchtern, Landwirten und auch Tierärzten nicht mehr ganz oben auf der Prioritätenliste

stehen. Die Gefahr, dass eventuell auftretende Fälle somit nicht registriert werden, ist entsprechend groß.

12 197 weitere Tiere verschiedenster Rassen, die ebenfalls mit dem Custom Chip genotypisiert worden waren, waren alle homozygot für das Referenzallel des SNP an Position 49 878 773 bp. Derselbe Genotyp trat bei vier Fleckvieh-Tieren, einem Swiss Simmental und einem Holstein auf, die zwar alle den in Kapitel 4.4 identifizierten Weaver-Haplotypen trugen, damit aber weder Anlage- noch Merkmalsträger des Weaver-Syndroms waren. Eine vergleichbare Situation war im Jahr 2013 im Zusammenhang mit einer weiteren Erbkrankheit im Braunvieh, der Spinalen Muskelatrophie (SMA), beobachtet worden. Aus dem verwendeten Tierset von 11 000 Braunvieh/Brown Swiss und 400 Original Braunvieh-Tieren waren acht OBV, welche heterozygot für den SMA-Haplotypen waren, per Gentest untersucht worden. Keines dieser Tiere trug die Mutation (persönliche Information Dr. Franz Seefried, 27.11.2015). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass vom Vorhandensein eines Haplotypen nicht automatisch auch auf das Vorhandensein der genetischen Varianten im Hintergrund geschlossen werden kann und die Kandidaten-Mutation an Position 49 878 773 bp außerhalb der Rasse Braunvieh/Brown Swiss mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auftritt. FV0125, ein Sohn von FV0163 und vier Generationen entfernter Vorfahre von FV1031 mit heterozygotem Genotyp für den Weaver-Haplotypen, war ein bedeutender Bulle in der Fleckviehzucht. Sein starker Einsatz in der künstlichen Besamung könnte zur Verbreitung des Haplotypen in der Fleckviehpopulation beigetragen haben. Im Tierset des Lehrstuhls für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre wurde für Fleckvieh insgesamt eine Haplotypen-Frequenz von 0,004 ermittelt. Die Frequenz für Holstein lag mit 0,001 nochmals deutlich niedriger und auch ebenfalls unter der von MCCLURE et al. (2013) ermittelten Frequenz von 0,03. Da sich dieser Wert jedoch nur auf die oben genannten Tiere aus der hauseigenen Datenbank bezieht, darf insgesamt nur von groben Anhaltspunkten und nicht von repräsentativen Werten für die tatsächlichen Populationen ausgegangen werden.

5.6 Ausblick

In der vorliegenden Studie wurden verschiedenste Methoden wie die *cLDLA*-Kartierung, Nutzung von Sequenzdaten aus dem *1000 Bull Genomes Project* und Auswertung bzw. teilweise Neubewertung alten Probenmaterials geschickt miteinander kombiniert, um die kausale Mutation für das Weaver-Syndrom ausfindig zu machen. Die Ergebnisse unserer Analysen sprechen dafür, dass es sich bei dem nicht-synonymen SNP an Position 49 878 773 bp auf BTA4 mit hoher Wahrscheinlichkeit um die auslösende Mutation hinter dem Weaver-Syndrom handelt. Zum endgültigen Beweis dieser Kausalität sind weiterführende Untersuchungen vonnöten, welche die Auswirkungen des Basenaustausches im Gen *PNPLA8* auf die Mechanismen in der Zelle genauer beleuchten.

Denkbar wäre in diesem Zusammenhang der Einsatz von Immunfluoreszenzmethoden, um das veränderte Genprodukt in den verschiedenen Kompartimenten und Organellen der Zelle sichtbar zu machen und zu verfolgen. Da aufgrund von konsequentem Einsatz des indirekten Gentests und Vermeidung von Träger-Anpaarungen seit 1997 kein neuer Fall mehr in der Tierpathologie der LMU München diagnostiziert wurde, ist aktuelles Probenmaterial von am Weaver-Syndrom erkrankten Tieren nicht verfügbar. Stattdessen müsste auf die im Archiv der Tierpathologie der LMU München eingelagerten Rückenmarksproben zurückgegriffen werden.

Alternativ wäre der Einbau der Mutation mithilfe von CRISPR/Cas9 (DOUDNA & CHARPENTIER, 2014) in einer geeigneten Zellkultur möglich. Dafür müsste eine passende Rinderzelllinie, noch besser eine bovine Neuronenlinie, gefunden werden, um in dieser dann die zu untersuchende Punktmutation herbeizuführen. Die Nutzung von Zellen aus einem anderen Gewebe bzw. einer anderen Tierart wäre theoretisch möglich, würde jedoch stets die Frage der Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse auf die Situation im Rind aufwerfen. In neuronalen Zellkulturen stellt sich hingegen das Problem der hohen Empfindlichkeit (MILLET et al., 2007) und begrenzten Teilungsfähigkeit der Neuronen (GORDON et al., 2013), so dass die Vermehrung von Zellen mit korrekt eingebauter Mutation sich relativ schwierig gestalten würde. Dies wäre jedoch die Voraussetzung, um ausgewählte Reaktionsprodukte des Enzyms verfolgen und aus den beobachteten

Veränderungen Schlüsse auf die Pathogenese des Weaver-Syndroms ziehen zu können.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, per Feinkartierung und Kandidatengenanalyse das auslösende Gen der Bovinen progressiven degenerativen Myeloenzephalopathie (Weaver-Syndrom) in reinrassigen Brown Swiss und Brown Swiss x Braunvieh Kreuzungen zu identifizieren. Mithilfe eines indirekten Gentests auf Basis von sechs Mikrosatellitenmarkern und durch Zuchtausschluss von Anlageträgern war es in den letzten zwei Jahrzehnten gelungen, das Auftreten neuer Erkrankungsfälle zu verhindern. Im Jahr 2013 wurden 41 diagnostische SNPs und ein Weaver-Haplotyp als neue Diagnosemethode vorgestellt, deren Anwendung zur Identifikation einer Reihe von bisher unbekannten Anlageträgern führte, die in keinem offensichtlichen Verwandtschaftsverhältnis zu den bereits bekannten Anlageträgern standen. Da das kausale Gen weiterhin unbekannt blieb, führte dieser aktuelle Anlass unter den Züchtern zu großer Unsicherheit bezüglich der populationsweiten Frequenz der Mutation und des sich daraus ergebenden Risikos eines erneuten Auftretens von Erkrankungsfällen.

Grundlage für die Kartierung per kombinierter Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungsanalyse (*cLDLA*) waren die Genotypen von 43 Merkmals-trägern, 31 Anlageträgern und 86 Weaver-freien Tieren. Der auf diese Weise ermittelte maximale *Likelihood ratio test statistic* Wert an Position 49 812 384 bp auf BTA4 und das zugehörige 0,853-Mb Konfidenzintervall waren wiederum in ein Homozygotiesegment von 1,72-Mb Größe eingebettet, innerhalb dessen Grenzen Sequenzdaten aus *Run4* des *1000 Bull Genomes Project* nach Sequenzvarianten durchsucht wurden. Eine Assoziation mit dem Weaver-Phänotyp, d. h. ein heterozygoter Genotyp in zwei bekannten Weaver-Anlageträgern, während die restlichen 1145 Bullen alle homozygot für das Referenzallel waren, trat dabei sowohl für einen nicht-synonymen SNP an Position 49 878 773 bp als auch für einen synonymen SNP an Position 50 858 538 bp auf, wobei letzterer jedoch außerhalb des genannten Homozygotiesegments lag. Weiterführende Untersuchungen, welche gezielte Genotypisierungen mithilfe der PCR-RFLP Methode, die Analyse von Abstammungsdaten und Beurteilungen von histopathologischen Schnittpräparaten beinhalteten, sprachen ebenfalls eindeutig gegen den SNP an Position 50 858 538 bp, wohingegen der SNP an Position 49 878 773 bp als

wahrscheinlichster Kandidat für die Weaver-Mutation bestätigt werden konnte. Im Laufe der Analysen stellte sich zudem heraus, dass es sich bei sechs Merkmalsträgern um falsch positive Weaver-Fälle handelte. Erst nach Entfernung dieser Tiere aus der Fallgruppe einer parallel durchgeführten Fall-Kontroll-Kartierung, deren Ergebnisse Vergleichswerte für die *cLDLA* liefern sollten, konnte auch hier eine Assoziation zwischen einem chromosomalen Segment auf BTA4 und dem Auftreten des Weaver-Syndroms ermittelt werden. Die *cLDLA*-Methode bietet somit gegenüber Fall-Kontroll-Analysen den Vorteil, dass selbst falsch positive Tiere in der Testpopulation zu einem verlässlichen Kartierungsergebnis führen. Gleichzeitig wird eine höhere Kartierungsgenauigkeit erreicht, so dass die *cLDLA* für die angestrebte Feinkartierung als Methode der Wahl bestätigt wurde.

Anhand einer Stichprobe von Braunvieh/Brown Swiss aus den Geburtsjahrgängen 2013 bis 2015 wurde die Frequenz des Kandidaten-SNPs an Position 49 878 773 bp in der genetisch aktiven Population geschätzt. Der dabei ermittelte Wert von 0,26 % und die statistische Erwartung von einem Fall pro 605 000 Geburten zeigen, dass die Mutation noch immer in der Population vorhanden ist und weiterhin per Populationsmonitoring verfolgt werden sollte. Ein gehäuftes Wiederauftreten von Weaver-Fällen ist jedoch nicht zu erwarten. Zwar konnte gezeigt werden, dass der Weaver-Haplotyp ebenfalls in Rassen wie Fleckvieh, Swiss Simmental und Holstein auftritt, die Mutation selbst wurde jedoch in keiner Rasse außerhalb von Braunvieh/Brown Swiss nachgewiesen.

Unter Einbezug aller Ergebnisse der hier durchgeführten Analysen lässt sich zusammenfassend sagen, dass eine eindeutige Assoziation mit dem Weaver-Phänotyp nur für den SNP an Position 49 878 773 bp nachgewiesen werden konnte und es sich bei diesem nicht-synonymen Basenaustausch im Gen *PNPLA8* mit hoher Wahrscheinlichkeit um die kausale Mutation handelt. Um endgültige Beweise für die Kausalität des SNP zu liefern und die Pathogenese des Weaver-Syndroms auf zellulärer Ebene detailliert aufzuklären, ist weitere Forschung notwendig.

7 Summary

This thesis aimed to fine map and, if possible, identify the causal mutation behind Weaver syndrome (Bovine progressive degenerative myeloencephalopathy), a heritable neurodegenerative disorder in pure and crossbred Brown Swiss cattle. Over the last two decades, the occurrence of new cases of Weaver syndrome had been prevented through the use of an indirect genetic test based on six microsatellite markers and the consequent exclusion of Weaver carriers. In 2013, 41 diagnostic SNPs and a common haplotype were introduced as a new diagnostic tool that identified several previously unknown carriers; these new carriers, however, came from Weaver-free ancestors. Consequently, without knowledge of the causative gene, breeders were increasingly concerned about the population-wide frequency of the gene and a possible re-occurrence of Weaver cases.

Based on genotypes of 43 Weaver affected, 31 Weaver carriers and 86 Weaver free animals, a combined linkage/linkage disequilibrium mapping approach (*cLDLA*) was conducted that led to a maximum likelihood ratio test statistic value at position 49 812 384 bp on BTA4. The corresponding 0.853-Mb confidence interval overlapped with a 1.72-Mb segment of extended homozygosity that was screened for sequence variants using whole-genome sequence data from Run4 of the 1000 bull genomes project. A perfect association with Weaver status was detected for a non-synonymous SNP at position 49 878 773 bp that was exclusively heterozygous in two official Weaver carriers, while all 1145 other bulls were homozygous for the reference allele. A second perfectly associated mutation was detected in close vicinity but outside the homozygous segment at position 50 858 538 bp. These SNPs had also been pointed out by MCCLURE et al. (2013) as two of the likeliest candidate causal mutations for Weaver syndrome. Further analyses including targeted genotyping by PCR-RFLP, assessment of pedigree records and histopathological sections, however, excluded the SNP at position 50 858 538 bp as a potential candidate. The association between the Weaver phenotype and the SNP at position 49 878 773 bp, on the other hand, was supported by the results of these analyses, which additionally revealed six phenocopies among the Weaver case group. A parallel case-control mapping approach, which was conducted to obtain comparative

values for the *cLDLA* design, was only successful in identifying an association of a chromosomal region with Weaver syndrome after exclusion of these animals that, in hindsight, had proven to be phenocopies. The ability of the *cLDLA* approach to even handle false positive animals in the testing population while obtaining results at an even higher precision confirmed this approach as the method of choice for the analyses carried out in this thesis.

Furthermore, the frequency of the candidate SNP at position 49 878 773 bp was estimated in a random sample of current Braunvieh/Brown Swiss born between 2013 and 2015. The relatively low value of 0.26 % and a statistically expected ratio of 1 case per 605 000 births show that the mutation is still present and should not be excluded from population monitoring. An imminent reoccurrence of large numbers of Weaver cases, however, is not to be expected. Although the Weaver haplotype was also detected in Fleckvieh, Swiss Simmental and Holstein, the mutation itself was not found in any other breed besides Braunvieh/Brown Swiss.

Taking the results of all analyses into consideration, a perfect association with the occurrence of Weaver syndrome could only be proven for the SNP at position 49 878 773 bp. The non-synonymous base substitution in *PNPLA8* therefore remains as the most probable cause of this heritable neurodegenerative disease. To further prove its causal character and thus enhance our understanding of the pathogenesis of Weaver syndrome, future research into the cellular mechanisms altered by the mutation is needed.

8 Literaturverzeichnis

- Abdallah J.M., Mangin B., Goffinet B., Cierco-Ayrolles C., Perez-Enciso M. (2004)** A comparison between methods for linkage disequilibrium fine mapping of quantitative trait loci. *Genet Res* 83: 41-7.
- Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. (2010)** A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7: 248-9.
- Agerholm J.S. (2007)** Inherited Disorders in Danish Cattle. *APMIS* 115: 1-76.
- Akey J., Jin L., Xiong M. (2001)** Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain? *Eur J Hum Genet* 9: 291-300.
- Allgäuer Herdebuchgesellschaft (2015)** Die Allgäuer Herdebuchgesellschaft - Die wichtigsten Zahlen. <http://www.ahg-kempten.de/Die-AHG>. Abgerufen am 13. Januar 2016.
- Allgäuer Original Braunviehzuchtverein e.V. (2010)** Rasseportrait - Exterieur (Äußere Merkmale). <http://www.originalbraunviehzuchtverein.de/index.php?id=18,0,0,1,0,0>. Abgerufen am 14. Dezember 2015.
- Allgäuer Original Braunviehzuchtverein e.V. (2011)** Zuchtziel des OBV. <http://www.originalbraunviehzuchtverein.de/index.php?id=17,0,0,1,0,0>. Abgerufen am 14. Dezember 2015.
- Allgäuer Original Braunviehzuchtverein e.V. (2015)** Zuchtgeschichte. <http://www.originalbraunviehzuchtverein.de/index.php?zuchtgeschichte> Abgerufen am 13. Januar 2016.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990)** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-10.
- Anderson D., Billingham R.E., Lampkin G.H., Medawar P.B. (1951)** The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity (Edinb)* 5: 379-97.
- Andersson L., Georges M. (2004)** Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nat Rev Genet* 5: 202-12.
- Angel A. (1977)** Processing of sensory information. *Prog Neurobiol* 9: 1-122.
- Arias J.A., Keehan M., Fisher P., Coppieters W., Spelman R. (2009)** A high density linkage map of the bovine genome. *BMC Genet* 10: 18.

- Arnheim N., Calabrese P., Nordborg M. (2003)** Hot and cold spots of recombination in the human genome: the reason we should find them and how this can be achieved. *Am J Hum Genet* 73: 5-16.
- Averdunk G., Gottschalk A. (1975)** Möglichkeiten der Kreuzungszucht beim Zweinutzungsrind. Brown-Swiss x Braunvieh in Bayern - eine Zwischenbilanz. *Züchtungskunde* 47: 393-403.
- Baird J.D., Sarmiento U.M., Basrur P.K. (1988)** Bovine progressive degenerative myeloencephalopathy (weaver syndrome) in brown swiss cattle in Canada: a literature review and case report. *Can Vet J* 29: 370-7.
- Baldrighi M., Scanziani E., Perotti G. (1992)** La mieloencefalopatia progressiva degenerativa bovina (sindrome "weaver") della razza Bruna. *Doc Vet* 4: 73-5.
- Ball A.D., Stapley J., Dawson D.A., Birkhead T.R., Burke T., Slate J. (2010)** A comparison of SNPs and microsatellites as linkage mapping markers: lessons from the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *BMC Genomics* 11: 218.
- Basrur P.K., Kanagawa H. (1969)** Parallelism in Chimeric Ratios in Heterosexual Cattle Twins. *Genetics* 63: 419-25.
- Bateson W., Saunders E.R., Punnett R.C. (1905)** Experimental studies in the physiology of heredity. Rep Evol Committee, Roy Soc London 2: 1-55, 80-99.
- Bateson W., Punnett R.C. (1911)** On the Inter-Relations of Genetic Factors. *Proc R Soc Lond B* 84: 3-8.
- Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft** Bayerische Zuchtwert-Informationen BaZI Rind. <http://www.lfl-design3.bayern.de/itz/rind/bazi/index.php>. Abgerufen am 08. Juli 2015.
- Berry D.P., Bermingham M.L., Good M., More S.J. (2011)** Genetics of animal health and disease in cattle. *Ir Vet J* 64: 5.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980)** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-31.
- Braun U., Ehrensperger F., Bracher V. (1987)** The Weaver syndrome in cattle. Clinical, biochemical and pathologico-anatomic studies in a Braunvieh/Brown Swiss cow with bovine progressive degenerative myeloencephalopathy. *Tierärztl Prax* 15: 139-44.
- Braun U., Gerspach C., Salis F., Feige K. (2003)** Klinische Befunde bei 4 Rindern mit Abszess in der Halswirbelsäule. *Schweiz Arch Tierheilkd* 145: 124-8.

- Braunvieh Schweiz** BrunaNet. <http://www2.braunvieh.ch/ArgusB/>. Abgerufen am 15. Juni 2015.
- Briggs H.M., Briggs D.M. (1980)** Modern breeds of livestock, 4. Aufl. Macmillan Publishing Co., Inc., New York, USA
- Brookes A.J. (1999)** The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-86.
- Brown Swiss Cattle Breeders' Association (2014a)** The History of Brown Swiss. <http://brownswissusa.com/Breed/History/tabid/89/Default.aspx>. Abgerufen am 11. Januar 2016.
- Brown Swiss Cattle Breeders' Association (2014b)** Trivia. <http://www.brownswissusa.com/Breed/BrownSwissBreed/Trivia/tabid/82/Default.aspx>. Abgerufen am 12. Januar 2016.
- Brown Swiss Cattle Breeders' Association (2014c)** Brown Swiss Breed. <http://brownswissusa.com/Breed/BrownSwissBreed/tabid/173/Default.aspx>. Abgerufen am 14. Dezember 2015.
- Brown T.A. (2007)** Genomes, 3. Aufl. Garland Science Publishing, New York, USA
- Browning B.L., Browning S.R. (2009)** A unified approach to genotype imputation and haplotype-phase inference for large data sets of trios and unrelated individuals. *Am J Hum Genet* 84: 210-23.
- Browning S.R., Browning B.L. (2007)** Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. *Am J Hum Genet* 81: 1084-97.
- Browning S.R. (2008)** Missing data imputation and haplotype phase inference for genome-wide association studies. *Hum Genet* 124: 439-50.
- Browning S.R., Browning B.L. (2011)** Haplotype phasing: existing methods and new developments. *Nat Rev Genet* 12: 703-14.
- Charlier C., Coppieters W., Rollin F., Desmecht D., Agerholm J.S., Cambisano N., Carta E., Dardano S., Dive M., Fasquelle C., Frennet J.C., Hanset R., Hubin X., Jorgensen C., Karim L., Kent M., Harvey K., Pearce B.R., Simon P., Tama N., Nie H., Vandeputte S., Lien S., Longeri M., Fredholm M., Harvey R.J., Georges M. (2008)** Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nat Genet* 40: 449-54.
- Chen X., Sullivan P.F. (2003)** Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *Pharmacogenomics J* 3: 77-96.

- Cole J.B. (2015)** A simple strategy for managing many recessive disorders in a dairy cattle breeding program. *Genet Sel Evol* 47: 1-13.
- Cortazzo P., Cervenansky C., Marin M., Reiss C., Ehrlich R., Deana A. (2002)** Silent mutations affect in vivo protein folding in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 537-41.
- Cuenca J., Aleza P., Navarro L., Ollitrault P. (2013)** Assignment of SNP allelic configuration in polyploids using competitive allelespecific PCR: application to citrus triploid progeny. *Ann Bot* 111: 731-42.
- Cunningham F., Amode M.R., Barrell D., Beal K., Billis K., Brent S., Carvalho-Silva D., Clapham P., Coates G., Fitzgerald S., Gil L., Girón C.G., Gordon L., Hourlier T., Hunt S.E., Janacek S.H., Johnson N., Juettemann T., Kähäri A.K., Keenan S., Martin F.J., Maurel T., McLaren W., Murphy D.N., Nag R., Overduin B., Parker A., Patricio M., Perry E., Pignatelli M., Riat H.S., Sheppard D., Taylor K., Thormann A., Vullo A., Wilder S.P., Zadissa A., Aken B.L., Birney E., Harrow J., Kinsella R., Muffato M., Ruffier M., Searle S.M.J., Spudich G., Trevanion S.J., Yates A., Zerbino D.R., Flicek P. (2015)** Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res* 43: D662-D9.
- Daetwyler H.D., Capitan A., Pausch H., Stothard P., van Binsbergen R., Brondum R.F., Liao X., Djari A., Rodriguez S.C., Grohs C., Esquerre D., Bouchez O., Rossignol M.N., Klopp C., Rocha D., Fritz S., Eggen A., Bowman P.J., Coote D., Chamberlain A.J., Anderson C., VanTassell C.P., Hulsege I., Goddard M.E., Guldbbrandtsen B., Lund M.S., Veerkamp R.F., Boichard D.A., Fries R., Hayes B.J. (2014)** Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nat Genet* 46: 858-65.
- De Marchi M., Bittante G., Dal Zotto R., Dalvit C., Cassandro M. (2008)** Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss breeds on quality of milk and cheese. *J Dairy Sci* 91: 4092-102.
- DeNise S.K., Medrano J.F. (2005)** Genetic analysis of the Weaver (BPDME) locus on bovine chromosome 4(Hrsg.), USDA-CRIS Update, Project No. CA-D*-ASC-7242-CG
- DeWan A., Klein R.J., Hoh J. (2007)** Linkage Disequilibrium Mapping for Complex Disease Genes. In: Collins A.R. (Hrsg.), *Linkage Disequilibrium and Association Mapping: Analysis and Applications*, 1. Aufl. Humana Press, Totowa, USA
- Dinno A. (2012)** paran: Horn's Test of Principal Components/Factors. <http://cran.r-project.org/web/packages/paran/index.html>. Abgerufen am 12. Mai 2015.
- Divers T., Peek S. (2008)** *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, 2. Aufl. Saunders Elsevier, St. Louis, USA

- Doll K., Trela T., Matzke P., Dahme E., Hafner A., Dirksen G. (1993)** Bovine progressive degenerative Myeloencephalopathie ("Weaver-Syndrom") bei Brown Swiss x Braunvieh-Rindern: Klinik, Verlauf, Blut- und Liquorbefunde. *Tierärztl Umschau* 48: 467-76.
- Doudna J.A., Charpentier E. (2014)** Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096.
- Drögemüller C., Engensteiner M., Moser S., Rieder S., Leeb T. (2009)** Genetic mapping of the belt pattern in Brown Swiss cattle to BTA3. *Anim Genet* 40: 225-9.
- Durkin K., Coppieters W., Drögemüller C., Ahariz N., Cambisano N., Druet T., Fasquelle C., Haile A., Horin P., Huang L., Kamatani Y., Karim L., Lathrop M., Moser S., Oldenbroek K., Rieder S., Sartelet A., Solkner J., Stalhammar H., Zelenika D., Zhang Z., Leeb T., Georges M., Charlier C. (2012)** Serial translocation by means of circular intermediates underlies colour sidedness in cattle. *Nature* 482: 81-4.
- el Hamidi M., Leipold H.W., Cook J.E. (1990)** Ultrastructural changes in Brown Swiss cattle affected with bovine progressive degenerative myeloencephalopathy (Weaver syndrome). *Zentralbl Veterinarmed A* 37: 729-36.
- Engeler W. (1947)** Das schweizerische Braunvieh, Monographie und Quellenwerk über die Braunviehrasse, ihre Verbreitung, Züchtung und Förderung in Geschichte und Gegenwart, 1. Aufl. Verlag Huber & Co. AG, Frauenfeld, CH
- FAO (2007)** The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Rischkowsky B., Pilling D. (Hrsg.), Rom, IT
- Farnir F., Coppieters W., Arranz J.J., Berzi P., Cambisano N., Grisart B., Karim L., Marcq F., Moreau L., Mni M., Nezer C., Simon P., Vanmanshoven P., Wagenaar D., Georges M. (2000)** Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Res* 10: 220-7.
- Farnir F., Grisart B., Coppieters W., Riquet J., Berzi P., Cambisano N., Karim L., Mni M., Moisio S., Simon P., Wagenaar D., Vilkki J., Georges M. (2002)** Simultaneous mining of linkage and linkage disequilibrium to fine map quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: revisiting the location of a quantitative trait locus with major effect on milk production on bovine chromosome 14. *Genetics* 161: 275-87.
- Farooqui A.A., Yang H.C., Rosenberger T.A., Horrocks L.A. (1997)** Phospholipase A2 and its role in brain tissue. *J Neurochem* 69: 889-901.
- Feinberg K., Eshed-Eisenbach Y., Frechter S., Amor V., Salomon D., Sabanay H., Dupree J.L., Grumet M., Brophy P.J., Shrager P.,**

- Peles E. (2010)** A glial signal consisting of gliomedin and NrCAM clusters axonal Na⁺ channels during the formation of nodes of Ranvier. *Neuron* 65: 490-502.
- Felius M. (2007)** Cattle Breeds: An Encyclopedia, 1. Aufl. Trafalgar Square Books, North Pomfret, USA
- Felius M., Beerling M.-L., Buchanan D.S., Theunissen B., Koolmees P.A., Lenstra J.A. (2014)** On the History of Cattle Genetic Resources. *Diversity* 6: 705-50.
- Fewson D., Ott A., Schulte-Coerne H.-J. (1975)** Einkreuzung von Brown Swiss Tieren aus den USA in das württembergische Braunvieh. *Züchtungskunde* 47: 382-92.
- Fiedler A. (1994)** Das "Weaver-Syndrom" des Braunvieh X Brown Swiss-Rindes: Immunhistochemische Darstellung der Neurofilamentprotein-Verteilung im Nervensystem sowie enzymhistochemische Untersuchungen ausgewählter Skelettmuskulatur. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Fitzli D., Stoeckli E.T., Kunz S., Siribour K., Rader C., Kunz B., Kozlov S.V., Buchstaller A., Lane R.P., Suter D.M., Dreyer W.J., Sonderegger P. (2000)** A direct interaction of axonin-1 with NgCAM-related cell adhesion molecule (NrCAM) results in guidance, but not growth of commissural axons. *J Cell Biol* 149: 951-68.
- Frahm K. (1990)** Rinderrassen in den Ländern der Europäischen Gemeinschaft, 2. Aufl. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Garza J.C., Freimer N.B. (1996)** Homoplasy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees. *Genome Res* 6: 211-7.
- Geldermann H. (1975)** Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers I. Methods. *Theor Appl Genet* 46: 319-30.
- Geldermann H. (2005)** Tier-Biotechnologie, 1. Aufl. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- GeneControl GmbH** Rinder - Abstammungsuntersuchung/Identitätsnachweis. <http://www.genecontrol.de/dnarind.html>. Abgerufen am 10. Februar 2016.
- Georges M., Dietz A.B., Mishra A., Nielsen D., Sargeant L.S., Sorensen A., Steele M.R., Zhao X., Leipold H., Womack J.E., et al. (1993)** Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1058-62.

- Georges M. (2007)** Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait Loci in domestic animals. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8: 131-62.
- Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen e.V. (2015)** Die Gefährdete Nutzierrasse des Jahres 2016. <http://www.g-e-h.de/geh/index.php/pressemitteilungen>. Abgerufen am 13. Januar 2016.
- Gilmour A.R., Gogel B.J., Cullis B.R., Thompson R. (2009)** ASReml User Guide (Release 3.0). <http://vsni.de/downloads/asreml/release3/UserGuide.pdf>. Abgerufen am 12. Mai 2015.
- Goddard M.E., Hayes B.J. (2009)** Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nat Rev Genet* 10: 381-91.
- Goldschmidt R. (1935)** Gen und Außeneigenschaft (Untersuchungen an *Drosophila*) I. *Z Indukt Abstamm Vererbungs* 69: 38-69.
- Gordon J., Amini S., White M.K. (2013)** General overview of neuronal cell culture. *Methods Mol Biol* 1078: 1-8.
- Gorroochurn P. (2008)** Perils in the use of linkage disequilibrium for fine gene mapping: simple insights from population genetics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 3292-7.
- Graur D. (2003)** Single-base Mutation. In: Cooper D.N. (Hrsg.), *Nature Encyclopedia of the Human Genome*, 1. Aufl. Nature Publishing Group, London, GB
- Gunderson K.L., Steemers F.J., Lee G., Mendoza L.G., Chee M.S. (2005)** A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet* 37: 549-54.
- Guo X., Elston R.C. (1999)** Linkage information content of polymorphic genetic markers. *Hum Hered* 49: 112-8.
- Gurgul A., Rubiś D., Bugno-Poniewierska M. (2014)** The effect of using DNA obtained from blood of cattle with genetic chimerism on Illumina's Beadchip assay performance. *Ann Anim Sci* 14: 279.
- Hafner A., Schmidt P., Dahme E., Dirksen G. (1991)** The bovine weaver syndrome. *Clin Neuropathol* 10: 34.
- Hagger C. (2005)** Estimates of genetic diversity in the brown cattle population of Switzerland obtained from pedigree information. *J Anim Breed Genet* 122: 405-13.
- Haldane J.B.S. (1919)** The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J Genet* 8: 299-309.

- Hästbacka J., de la Chapelle A., Kaitila I., Sistonen P., Weaver A., Lander E. (1992)** Linkage disequilibrium mapping in isolated founder populations: diastrophic dysplasia in Finland. *Nat Genet* 2: 204-11.
- Hayes B.J., Visscher P.M., McPartlan H.C., Goddard M.E. (2003)** Novel multilocus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. *Genome Res* 13: 635-43.
- Hayes B.J., Fries R., Lund M.S., Boichard D.A., Stothard P., Veerkamp R.F., Tassell C., Anderson C.L., Hulsege B., Guldbrandtsen B., Rocha D., Hinrichs D., Bagnato A., Georges M., Spelman R.J., Reecy J.M., Archibald A.L., Goddard M.E., Gredler B. (2012)** 1000 Bull Genomes Consortium Project. Plant and Animal Genome XX Conference. San Diego, CA, USA
- Heinrichs A.J., Hargrove G.L. (1994)** Standards of Weight and Height for Ayrshire, Brown Swiss, and Milking Shorthorn Heifers. *J Dairy Sci* 77: 1676-81.
- Heuven H.C., Bovenhuis H., Janss L.L., van Arendonk J.A. (2005)** Efficiency of population structures for mapping of Mendelian and imprinted quantitative trait loci in outbred pigs using variance component methods. *Genet Sel Evol* 37: 635-55.
- Hinrichs A.L., Larkin E.K., Suarez B.K. (2009)** Population Stratification and Patterns of Linkage Disequilibrium. *Genet Epidemiol* 33: S88-S92.
- Hoeschele I., Meinert T.R. (1990)** Association of genetic defects with yield and type traits: the weaver locus effect on yield. *J Dairy Sci* 73: 2503-15.
- Hortsch M. (2000)** Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci* 15: 1-10.
- Ihara N., Takasuga A., Mizoshita K., Takeda H., Sugimoto M., Mizoguchi Y., Hirano T., Itoh T., Watanabe T., Reed K.M., Snelling W.M., Kappes S.M., Beattie C.W., Bennett G.L., Sugimoto Y. (2004)** A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res* 14: 1987-98.
- Illumina Inc. (2012)** Data Sheet: DNA Analysis, BovineSNP50 Genotyping BeadChip. http://products.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_bovine_snp50.pdf. Abgerufen am 10. November 2014.
- Illumina Inc. (2015)** Datasheet: Agrigenomics, Bovine HD Genotyping BeadChip. http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovineHD.pdf. Abgerufen am 22. Januar 2016.
- Jorde L.B. (2000)** Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res* 10: 1435-44.

- Kinsey G.R., Blum J.L., Covington M.D., Cummings B.S., McHowat J., Schnellmann R.G. (2008)** Decreased iPLA(2) γ expression induces lipid peroxidation and cell death and sensitizes cells to oxidant-induced apoptosis. *J Lipid Res* 49: 1477-87.
- Koegel S.L. (1975)** Genetisch-statistische Auswertungen am Material der bayerischen Braunviehpopulation (1967 bis 1971). Inaugural-Dissertation, Technische Universität München
- Kräusslich H. (1981)** Rinderzucht, 6. Aufl. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Kruglyak L. (1997)** The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet* 17: 21-4.
- Kudo I., Murakami M. (2002)** Phospholipase A2 enzymes. Prostaglandins Other Lipid Mediat 68–69: 3–58.
- Kustermann W. (1994)** Das Original Braunvieh. <http://www.g-e-h.de/geh-rind/braunv.htm>. Abgerufen am 03. November 2015.
- Kustermann W., Pirchner F. (1995)** Bewertung tiergenetischer Ressourcen am Beispiel des Original Braunviehs, 1. Mitteilung: Charakterisierung des Original Braunviehs mittels Leistungsvergleich zu modernem Kreuzungsbraunvieh. *Züchtungskunde* 67: 336-52.
- Kustermann W., Medjugorac I., Pirchner F. (1996)** Bewertung tiergenetischer Ressourcen am Beispiel des Original Braunviehs, 2. Mitteilung: Genetische Distanzen zwischen Original Braunvieh und Brown Swiss sowie anderen Rinderpopulationen. *Züchtungskunde* 68: 109-30.
- Lee S.H., Van der Werf J.H. (2006)** Using dominance relationship coefficients based on linkage disequilibrium and linkage with a general complex pedigree to increase mapping resolution. *Genetics* 174: 1009-16.
- Leipold H.W., Blaugh B., Huston K., Edgerly C.G., Hibbs C.M. (1973)** Weaver syndrome in Brown Swiss cattle: clinical signs & pathology. *Vet Med Small Anim Clin* 68: 645-7.
- Lewontin R.C., Kojima K.-i. (1960)** The Evolutionary Dynamics of Complex Polymorphisms. *Evolution* 14: 458-72.
- Lewontin R.C. (1988)** On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 120: 849-52.
- LGC Limited (2013)** KASP genotyping chemistry User guide and manual. <http://www.lgcgroup.com/LGCCGroup/media/PDFs/Products/Genotyping/KASP-genotyping-chemistry-User-guide.pdf>. Abgerufen am 3. März 2015.
- Lillie F.R. (1916)** The Theory of the Free-Martin. *Science* 43: 611-3.

- Lindauer M., Essl A. (1994)** Schätzung der Frequenzen rezessiver Letalgene für spinale Muskelatrophie, Spinnengliedrigkeit und Weaver-Syndrom beim österreichischen Braunvieh. *Züchtungskunde* 66: 54-65.
- Liu L., Zhang D., Liu H., Arendt C. (2013)** Robust methods for population stratification in genome wide association studies. *BMC Bioinformatics* 14: 132.
- Lynn S.P., Cohen L.K., Kaplan S., Gardner J.F. (1980)** RsaI: a new sequence-specific endonuclease activity from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J Bacteriol* 142: 380-3.
- Ma L., O'Connell J.R., VanRaden P.M., Shen B., Padhi A., Sun C., Bickhart D.M., Cole J.B., Null D.J., Liu G.E., Da Y., Wiggans G.R. (2015)** Cattle Sex-Specific Recombination and Genetic Control from a Large Pedigree Analysis. *PLoS Genet* 11: e1005387.
- Maignel L., Boichard D.A., Verrier E. (1996)** Genetic variability of French dairy breeds estimated from pedigree information. *Interbull Bulletin* 14: 49-54.
- Manatrion S., Egger-Danner C., Baumung R. (2009)** Estimating lethal allele frequencies in complex pedigrees via gene dropping approach using the example of Brown Swiss cattle. *Archiv Tierzucht* 52: 230-42.
- Mancuso D.J., Sims H.F., Han X., Jenkins C.M., Guan S.P., Yang K., Moon S.H., Pietka T., Abumrad N.A., Schlesinger P.H., Gross R.W. (2007)** Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2gamma leads to alterations in mitochondrial lipid metabolism and function resulting in a deficient mitochondrial bioenergetic phenotype. *J Biol Chem* 282: 34611-22.
- Maynard J., Haigh J. (2007)** The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet Res* 89: 391-403.
- McClure M., Kim E., Bickhart D., Null D., Cooper T., Cole J., Wiggans G., Ajmone-Marsan P., Colli L., Santus E., Liu G.E., Schroeder S., Matukumalli L., Van Tassell C., Sonstegard T. (2013)** Fine mapping for Weaver syndrome in Brown Swiss cattle and the identification of 41 concordant mutations across NRCAM, PNPLA8 and CTTNBP2. *PLoS One* 8: e59251.
- Medjugorac I., Russ I., Aumann J., Förster M. (1996)** Weaver carrier status effects on yield in German Brown cattle. *Anim Genet* 27 (Suppl. 2): 104.
- Mendel G. (1866)** Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn* 4: 3-47.

- Meuwissen T.H., Goddard M.E. (2000)** Fine mapping of quantitative trait loci using linkage disequilibria with closely linked marker loci. *Genetics* 155: 421-30.
- Meuwissen T.H., Karlsten A., Lien S., Olsaker I., Goddard M.E. (2002)** Fine mapping of a quantitative trait locus for twinning rate using combined linkage and linkage disequilibrium mapping. *Genetics* 161: 373-9.
- Meuwissen T.H., Goddard M.E. (2007)** Multipoint identity-by-descent prediction using dense markers to map quantitative trait loci and estimate effective population size. *Genetics* 176: 2551-60.
- Millet L.J., Stewart M.E., Sweedler J.V., Nuzzo R.G., Gillette M.U. (2007)** Microfluidic devices for culturing primary mammalian neurons at low densities. *Lab Chip* 7: 987-94.
- Moon S.H., Jenkins C.M., Liu X., Guan S., Mancuso D.J., Gross R.W. (2012)** Activation of mitochondrial calcium-independent phospholipase A2gamma (iPLA2gamma) by divalent cations mediating arachidonate release and production of downstream eicosanoids. *J Biol Chem* 287: 14880-95.
- Morgan T.H. (1911)** Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance. *Science* 34: 384.
- Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J., Bridges C.B. (1915)** The Mechanism of Mendelian heredity. Henry Holt and Company, New York, USA
- Morton N.E. (2005)** Linkage disequilibrium maps and association mapping. *J Clin Invest* 115: 1425-30.
- Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. (1999)** AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol* 14: 389-94.
- Müller W. (1958)** Die Rinderzucht in Österreich, 1. Aufl. Carl Gerold's Sohn Verlag, Wien, AT
- Murakami M., Masuda S., Ueda-Semmyo K., Yoda E., Kuwata H., Takanezawa Y., Aoki J., Arai H., Sumimoto H., Ishikawa Y., Ishii T., Nakatani Y., Kudo I. (2005)** Group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A2gamma promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A2. *J Biol Chem* 280: 14028-41.
- Ng P.C., Henikoff S. (2003)** SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31: 3812-4.
- Nicholson S.S. (1974)** Bovine posterior paralysis due to organophosphate poisoning. *J Am Vet Med Assoc* 165: 280-1.

- Niku M., Pessa-Morikawa T., Taponen J., Iivanainen A. (2007)** Direct observation of hematopoietic progenitor chimerism in fetal freemartin cattle. *BMC Vet Res* 3: 29.
- Nordborg M., Tavaré S. (2002)** Linkage disequilibrium: what history has to tell us. *Trends Genet* 18: 83-90.
- Olsen H.G., Lien S., Svendsen M., Nilsen H., Roseth A., Aasland Opsal M., Meuwissen T.H. (2004)** Fine mapping of milk production QTL on BTA6 by combined linkage and linkage disequilibrium analysis. *J Dairy Sci* 87: 690-8.
- Ota M., Fukushima H., Kulski J.K., Inoko H. (2007)** Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protocols* 2: 2857-64.
- Ott A. (1973)** Erfahrungen mit der Einkreuzung von Brown-Swiss in Württemberg. *Schweiz Landw Monatsh* 51: 2-12.
- Owen R.D. (1945)** Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 102: 400-1.
- Oyster R., Leipold H.W., Troyer D., Cash W., Johnson D. (1992a)** Histochemical and morphometric studies of peripheral muscle in bovine progressive degenerative myeloencephalopathy of brown Swiss cattle. *Zentralbl Veterinarmed A* 39: 321-7.
- Oyster R., Leipold H.W., Troyer D., Cash W. (1992b)** Electron microscopic studies of bovine progressive degenerative myeloencephalopathy in brown Swiss cattle. *Zentralbl Veterinarmed A* 39: 600-8.
- Pérez-Enciso M. (2003)** Fine mapping of complex trait genes combining pedigree and linkage disequilibrium information: a Bayesian unified framework. *Genetics* 163: 1497-510.
- Perrin F.E., Rathjen F.G., Stoeckli E.T. (2001)** Distinct subpopulations of sensory afferents require F11 or axonin-1 for growth to their target layers within the spinal cord of the chick. *Neuron* 30: 707-23.
- Plomin R., Haworth C.M., Davis O.S. (2009)** Common disorders are quantitative traits. *Nat Rev Genet* 10: 872-8.
- Plotkin J.B., Kudla G. (2011)** Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet* 12: 32-42.
- Powell J.E., Visscher P.M., Goddard M.E. (2010)** Reconciling the analysis of IBD and IBS in complex trait studies. *Nat Rev Genet* 11: 800-5.
- Pritchard J.K., Przeworski M. (2001)** Linkage Disequilibrium in Humans: Models and Data. *Am J Hum Genet* 69: 1-14.

- R Development Core Team (2013)** R: A language and environment for statistical computing(Hrsg.). Vienna: R Foundation for Statistical Computing
- Rinderunion Baden-Württemberg e.V. (2014)** Original Braunvieh (Braunvieh alter Zuchtichtung). <http://www.rind-bw.de/en/bullen/braunvieh/original-braunvieh/1204.html>. Abgerufen am 30. Dezember 2015.
- Rinderzucht Austria** ZAR/ZuchtData Zuchtwertdatenbank. http://cgi.zar.at/cgi-bin/zw_default.pl. Abgerufen am 8. Juli 2015.
- Roberts D. (1916)** Cattle, breeds and origin, 1. Aufl, Waukesha, USA
- Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. (2015)** REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. Nucleic Acids Res 43: D298-9.
- Russ I., Medjugorac I., Förster M. (1994)** Gendiagnose bei Weaver. Vortragstagung der DGfZ/GfT. Halle (Saale)
- Russ I., Medugorac I., Förster M. (1999)** Eine Bestätigung von QTL für Milch- und Proteinmenge auf BTA04 in der deutschen Braunviehpopulation. Vortragstagung der DGfZ/GfT. Giessen
- Sakurai T., Lustig M., Nativ M., Hemperly J.J., Schlessinger J., Peles E., Grumet M. (1997)** Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase beta. J Cell Biol 136: 907-18.
- Samraus H.H. (2011)** Farbatlas Nutztierassen, 7. Aufl. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Saunders C.J., Moon S.H., Liu X., Thiffault I., Coffman K., LePichon J.-B., Taboada E., Smith L.D., Farrow E.G., Miller N., Gibson M., Patterson M., Kingsmore S.F., Gross R.W. (2015)** Loss of function variants in human *PNPLA8* encoding calcium-independent phospholipase A2 γ recapitulate the mitochondriopathy of the homologous null mouse. Hum Mutat 36: 301-6.
- Schäfer B., Arbeitsgemeinschaft Deutsches Braunvieh (1996)** Mit deutschem Braunvieh ins 21. Jahrhundert: leistungsstark - qualitätsorientiert - vielseitig ; Ergebnisse aus der Zuchtzieldiskussion der Arbeitsgruppe der Arbeitsgemeinschaft Deutsches Braunvieh. Arbeitsgemeinschaft Dt. Braunvieh, München, Kempten
- Schulte-Coerne H.-J. (1976)** Untersuchungen über die Auswirkungen einer Einkreuzung von amerikanischen Brown Swiss Tieren in das württembergische Braunvieh. Inaugural-Dissertation, Universität Hohenheim

- Shastri B.S. (2009)** SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype. In: Komar A.A. (Hrsg.), Single Nucleotide Polymorphisms, 2. Aufl. Humana Press, Totowa, USA
- Slatkin M. (2008)** Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet* 9: 477-85.
- Smith W.L., DeWitt D.L., Garavito R.M. (2000)** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69: 145-82.
- Sölkner J., Filipcic L., Hampshire N. (1998)** Genetic variability of populations and similarity of subpopulations in Austrian cattle breeds determined by analysis of pedigrees. *Animal Science* 67: 249-56.
- Spahr S., Oppermann G. (1995)** The Dairy Cow Today: U.S. Trends, Breeding and Progress Since 1980, 2. Aufl. W.D. Hoard & Sons Company, Fort Atkinson, USA
- Steemers F.J., Chang W., Lee G., Barker D.L., Shen R., Gunderson K.L. (2006)** Whole-genome genotyping with the single-base extension assay. *Nat Methods* 3: 31-3.
- Stuart L.D., Leipold H.W. (1983a)** Bovine Progressive Degenerative Myeloencephalopathy ("Weaver") of Brown Swiss Cattle I: Epidemiology. *Bov Pract* 18: 129-32.
- Stuart L.D., Leipold H.W. (1983b)** Bovine Progressive Degenerative Myeloencephalopathy ("Weaver") of Brown Swiss Cattle II: Clinical and Laboratory Findings. *Bov Pract* 18: 133-46.
- Stuart L.D., Leipold H.W. (1985)** Lesions in bovine progressive degenerative myeloencephalopathy ("Weaver") of Brown Swiss cattle. *Vet Pathol* 22: 13-23.
- Sturtevant A.H. (1913)** The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *J Exp Zool* 14: 43-59.
- Suter D.M., Pollerberg G.E., Buchstaller A., Giger R.J., Dreyer W.J., Sonderegger P. (1995)** Binding between the neural cell adhesion molecules axonin-1 and Nr-CAM/Bravo is involved in neuron-glia interaction. *J Cell Biol* 131: 1067-81.
- Tautz D. (1989)** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17: 6463-71.
- Tenhumberg H., Trela T., Matzke P., Averdunk G., Dirksen G. (1994)** Bovine progressive degenerative myeloencephalopathy ("Weaver syndrome") in brown Swiss x Braunvieh cattle: reproductive occurrences, results of embryo transfer. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 107: 400-4.

- Terwilliger J.D., Weiss K.M. (1998)** Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality? *Curr Opin Biotechnol* 9: 578-94.
- Trela T. (1991)** Untersuchungen über Klinik und Verlauf der Bovinen progressiv-degenerativen Myeloenzephalopathie ("Weaver-Syndrom") bei Brown-Swiss x Braunviehrindern(Hrsg.). Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- van Ooijen J.W. (1992)** Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor Appl Genet* 84: 803-11.
- VanRaden P.M., Olson K.M., Null D.J., Hutchison J.L. (2011)** Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J Dairy Sci* 94: 6153-61.
- Vergnaud G., Denoeud F. (2000)** Minisatellites: Mutability and Genome Architecture. *Genome Res* 10: 899-907.
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. (2002)** A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 34: 275-305.
- Visscher P.M., Goddard M.E. (2004)** Prediction of the confidence interval of quantitative trait loci location. *Behav Genet* 34: 477-82.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., et al. (1995)** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-14.
- Weber J.L., May P.E. (1989)** Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44: 388-96.
- Weiß J.W., Pabst W., Granz S. (2013)** Tierproduktion, 14. Aufl. Enke Verlag, Stuttgart
- Weller J.I. (2001)** Quantitative Trait Loci Analysis in Animals, 1. Aufl. CABI Publishing, Wallingford, GB
- Weng Z.Q., Saatchi M., Schnabel R.D., Taylor J.F., Garrick D.J. (2014)** Recombination locations and rates in beef cattle assessed from parent-offspring pairs. *Genet Sel Evol* 46(1): 34.
- Wenz H.M., Robertson J.M., Menchen S., Oaks F., Demorest D.M., Scheibler D., Rosenblum B.B., Wike C., Gilbert D.A., Efcavitch J.W. (1998)** High-Precision Genotyping by Denaturing Capillary Electrophoresis. *Genome Res* 8: 69-80.
- Worku M. (2015)** Goat Genetics and Genomic Progress. In: Khatib H. (Hrsg.), *Molecular and Quantitative Animal Genetics*, 1. Aufl. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA

- Yoda E., Hachisu K., Taketomi Y., Yoshida K., Nakamura M., Ikeda K., Taguchi R., Nakatani Y., Kuwata H., Murakami M., Kudo I., Hara S. (2010)** Mitochondrial dysfunction and reduced prostaglandin synthesis in skeletal muscle of Group VIB Ca^{2+} -independent phospholipase A2gamma-deficient mice. *J Lipid Res* 51: 3003-15.
- Yoder D.M., Lush J.L. (1937)** A genetic history of the Brown Swiss cattle in the United States. *J Hered* 28: 154-60.
- Yu A., Zhao C., Fan Y., Jang W., Mungall A.J., Deloukas P., Olsen A., Doggett N.A., Ghebranious N., Broman K.W., Weber J.L. (2001)** Comparison of human genetic and sequence-based physical maps. *Nature* 409: 951-3.
- Zhang W., Collins A., Gibson J., Tapper W.J., Hunt S., Deloukas P., Bentley D.R., Morton N.E. (2004)** Impact of population structure, effective bottleneck time, and allele frequency on linkage disequilibrium maps. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 18075-80.
- Zimin A., Delcher A., Florea L., Kelley D., Schatz M., Puiu D., Hanrahan F., Pertea G., Van Tassell C., Sonstegard T., Marcais G., Roberts M., Subramanian P., Yorke J., Salzberg S. (2009)** A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol* 10: R42.

9 Anhang

Anhang 1: Zusammensetzung der Testpopulationen

Zusammensetzung der in den verschiedenen Analysen verwendeten Testpopulationen unter Berücksichtigung des Krankheitsstatus der Anlageträger (AT), Merkmalsträger (MT) und Weaver-freien (frei) Tiere, sowie der Zugehörigkeit zu den Rassen Original Braunvieh (OBV), Braunvieh bzw. Brown Swiss (BV/BS), Fleckvieh/Simmental (FV), Holstein (HOL) und weiteren Rassen (andere). Zusätzlich verwendete Tiere sind mit einem + gekennzeichnet.

| | AT | MT | frei | AT+ | MT+ | frei+ | Summe | OBV | BV/BS | FV | HOL | andere |
|--------------------------------------|----|----|------|-----|-----|-------|-------|-----|-------|----|-----|--------|
| Genotypisierung Grub | | 31 | | 2 | 1 | | 34 | | 34 | | | |
| Genotypen DB | 28 | 12 | 85 | | | | 125 | 34 | 91 | | | |
| Braunvieh Schweiz | 3 | | 1 | | | | 4 | | 4 | | | |
| cLDLA-Kartierung | 31 | 43 | 86 | | | | 160 | 34 | 126 | | | |
| Homozygotie-Kartierung 1 | | 43 | 86 | | | | 129 | 34 | 95 | | | |
| Homozygotie-Kartierung 2 | | 39 | 86 | | | | 125 | 34 | 91 | | | |
| Ermittlung Weaver-Haplotyp | 31 | 13 | | | | | 44 | | 44 | | | |
| PCR-RFLP 49 878 773 bp | 63 | 40 | | | | | 103 | | 103 | | | |
| PCR-RFLP 50 858 538 bp | 30 | 16 | | 1 | 4 | | 51 | | 51 | | | |
| PCR-RFLP 49 878 773 bp W0277-Familie | 4 | 3 | | | | | 7 | | 7 | | | |
| PCR-RFLP 50 858 538 bp W0277-Familie | 3 | 2 | | | | | 5 | | 5 | | | |
| KASPar 49 878 773 bp | 67 | 39 | | | | | 106 | | 106 | | | |
| Run4 1000 Bull Genomes Project | 2 | | 1145 | | | | 1147 | | 59 | | | 1088 |
| Custom Chip | 12 | | 2322 | | | 12197 | 14531 | | 2334 | | | 12197 |
| Weaver-Haplotyp andere Rassen | | | 6 | | | | 6 | | | 4 | 1 | 1 |



Anhang 2: Ermittlung eines geeigneten Restriktionsenzym für die gezielte Genotypisierung des SNP an Position 49 878 773 bp per PCR-RFLP

Das mithilfe der Datenbank REBASE® (ROBERTS et al. (2015), (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>)) ermittelte Restriktionsenzym RsaI schneidet die Sequenz nur bei Vorliegen des Referenzallels C. Bei Vorliegen des alternativen Allels T bleibt die DNA intakt.

(Quelle: NEBcutter V2.0, New England Biolabs Inc., <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>)



Anhang 3: Ermittlung eines geeigneten Restriktionsenzym für die gezielte Genotypisierung des SNP an Position 50 858 538 bp per PCR-RFLP

Mithilfe der Datenbank REBASE® (ROBERTS et al. (2015), (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>)) wurde RsaI als geeignetes Restriktionsenzym ermittelt. Bei Vorliegen des alternativen Allels A wird eine Schnittstelle erzeugt, bei Vorliegen des Referenzallels G bleibt die DNA intakt.

(Quelle: NEBcutter V2.0, New England Biolabs Inc., <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>)

Anhang 4: Ermittlung des gemeinsamen Weaver-Haplotypen auf BTA4

Vergleich der Haplotypen (M: maternal, P: paternal) von 31 Weaver-Anlageträgern mit den Haplotypen von 13 Nachkommen mit bestätigter Weaver-Diagnose im Bereich zwischen den Markerpositionen 46 008 312 bp und 52 138 962 bp auf BTA4 unter Beachtung der beiden Maxima aus der *cDLA*: Hauptmaximum (*) an Position 49 812 384 bp, zweites Maximum (^) an Position 47 598 264 bp. Übereinstimmende Segmente sind mit roter Schriftfarbe und rotem Hintergrund gekennzeichnet. Der gemeinsame Weaver-Haplotyp, welcher homozygot in allen Merkmalsträgern und heterozygot in allen Anlageträgern auftritt, wird durch grüne Schriftfarbe und grünen Hintergrund hervorgehoben.

| TierLID | M/P | Haplotyp |
|---------|-----|---|
| W0011 | M | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0011 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0035 | M | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0035 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0059 | M | AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACAAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0059 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0105 | M | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0105 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0109 | M | AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0109 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0139 | M | AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0139 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0155 | M | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0155 | P | AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGAGAGAGAGGGAA |
| W0173 | M | AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0173 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0242 | M | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0242 | P | AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |

W0246 M AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTAAAGGCGGGAGAGGAAGGAA
W0246 P AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0358 M AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0358 P AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0359 M AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0359 P AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0372 M AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0372 P AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
BV1597 M AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
BV1597 P AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATAACGAAGCG^ACGCACGAAGGGAGAAAAGAGAAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAATAAGGCGGGAGGGGAGAAG
BV1598 M AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACAAAGAGTAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
BV1598 P AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACACAGAGTAAAGGGGAGAGGAAGGGAACGGAAG*GGGGCAAAAGCACGTAAGGCGGGAGAGGAAGGAA
SM0213 M AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACAAAGAGAAAAGGGGAGAGGAAGGGAACGGAAG*GGGGCAAAAGCAAATAAGGCAGGAGGGGAAGGAA
SM0213 P AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0218 M AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0218 P AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATAACGAAGCG^ACGCACGAAGGGAGAAAAGAGAAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAATAAGGCGGGAGGGGAGAAG
W0252 M CGAGAAGGAAGGAACGGAAGCGTACAGGAGAG^AAACAAAGGAAGAACAAGGGTGGCAGGGAGAGGAAGAAGGCAGCGA*AAGGAGAAAGAAAGTGAAGGCGGGAGAGGAGAGAA
W0252 P AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0275 M AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACACAGAAAGAAGGGGAGAGGAAGGGAACGGAAG*GGGGCAAAAGCAAATAAGGCAGGAGGGGAAGGAA
W0275 P AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0278 M AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0278 P AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACAAAGAGAAAAGGGGAGAGGAAGGGAACGGAAG*GGGGCAAAAGCAAATAAGGCAGGAGGGGAAGGAA
W0279 M AAAGAAGGAAGGACCGGAAAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAGGGGACACAGAGAAAAGGAAAAGGAAGAAGGCAGCGA*AGGGAGAAAGAACGTAAGGCGGGAGAGGAAGGAA
W0279 P AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0280 M AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG
W0280 P AAGGAAGGAAGGAACAGAAAACATACCGGAGAG^GCACACGAAGGAGACAAAGGGTGGCAGAAAAGGAAGAAGGCAGCGA*AGAGCACCGGAAAGTAAAGGCAGGAGAAGAGGGAA

| | | |
|--------|---|--|
| W0282 | M | AAAGAAGGGAGAGAAAGAAAAACATACCGGAGCG^AAACACGAAGGAGGAACAGAGAAAAGGGAAAAGGAAGAAGGCAGCAG*AGAGCACCGGAACGTGAAGGCGGGGAGGGAGAAG |
| W0282 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0284 | M | AAGGAAGGAAGGAACGGAAGAGAACAGGAGCG^AAGCACGAAGGAGACAAAGGTTGAAGGGAGAGGAAAAGGCAGCAG*GGGGAGAAAGAGAGTGAAGGGGGAGGGGAAGGAA |
| W0284 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0312 | M | AAAGAAGGGAGGAACAAAAGAGAGAAACGAAGCG^ACGCACGAAGGGAGAAAAGAGAAAAGGGGAAAGGAAGAAAGCGGAAA*GGAGCAAAAGAACGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0312 | P | AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGAGAGGAGGGAA |
| W0380 | M | AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACAAAGAGAAAAGGGGAGAGGAAGGGAACGGAAG*GGGGCAAAAGCAAATAAGGCGGGGAGGGAGAAG |
| W0380 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0381 | M | AAGGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACAAAGAATGGAAGGGAGAGGAGGGAGGAGGCAG*AGAGAACCAGAACGTGAAGGCGGGAGAGGAAGGAA |
| W0381 | P | AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| W0383 | M | AAGGAAGGAAGGAACAGAAAAACATACCGGAGAG^GAACAAAGGAAGAGCAAGAATGGAAGGGAAGAGAAGAAGGCAGCGA*AGGGAGAAAGAACGTAAAGGCGGGAGAGGAAGGAA |
| W0383 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| WB0503 | M | AAAGAAGGGAAGACCGGAAAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAGGGGGACACAGAGAAAAGGAAAAAGGAGGGAGGAGGCAG*AGAGAACCAGAAAATAAGGCAGGAGGGGAAGGAA |
| WB0503 | P | AAGGAAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| WB0508 | M | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| WB0508 | P | AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACAAAGAGAAAAGGGGAGAGGAAGGGAACGGAAG*GGGGCAAAAGCAAATAAGGCAGGAGGGGAAGGAA |
| WB0525 | M | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| WB0525 | P | AAAGAAGGGAAGACCGGAAAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAGGGGGACACAGAGAAAAGGAAAAAGGAAGAAGGCAGCGA*AGGGAGAAAGAAAGTAAAGGCAGGAGGGGAAGGAA |
| WB0610 | M | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| WB0610 | P | AAAGAAGGGAGGAACAAAACGCAAGACGAAGCG^GCACACGAAGGAGACAAAGGTTGGCAGAAAAGGAAGAAGACGGAAG*AGAGCACCGGAAAGTAAAGGCAGGAGAGAGGGGAA |
| WB0616 | M | AAAGAAGGGAGGAACAAAAGAGAGAGCAGGAGAG^AAACAAAGGAAGAGCAAGAGAGAAGGGAAGGAAGAAGACGGAAG*GGGGCACCGGAAAATGAAGGCAGGAGAGGAGGGAA |
| WB0616 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| WB0617 | M | AAAGAAGGGAAGACCGGAAAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAGGGGGACACAGAGAAAAGGAAAAAGGAAGAAGGCAGCGA*AGGGAGAAAGAACGTGAAGGCGGGGAGGGAGAAG |
| WB0617 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |
| WB0695 | M | AAAGAAGGGAAGACCGGAAAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAGGGGGACACAGAGAAAAGGAAAAAGGAGGGAGGAGGCAG*AGAGAACCAGAAAATAAGGCAGGAGGGGAAGGAA |
| WB0695 | P | AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG |

WB0741 M AAGGAAGGAAGGAACAAAAAGAGAGCAGGAGCA^AAACAAAGGAAGAACAAGGGTGGCAGGGAGAGGAAGAAGGCAGCGA*AGGGAGAAAGAACGTGAAGGGGGGAAGGAAGGAA

WB0741 P AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG

WB0768 M AAGACAGGAAGGAACAAGCAAGCGAGCAGGAGCG^AAGCACGAAGGAGGCACAGAGAAAAAGGGAGAGGAAGAAGCAGCAG*AGAGCACCGGAACGTGAAGGGAGGAAGGGGAAGAA

WB0768 P AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG

WB0770 M AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG

WB0770 P AAGGAAGGAAGGAACAGAAAAACATACCGGAGAG^GAACAAAGGAAGAGCAAGAATGGAAGGGAAGAGAAGAAGGCAGCGA*AGGGAGAAAGAACGTAAAGGCGGGAGAGGAAGGAA

WB0775 M AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG

WB0775 P AAAGAAGGAAGGACCGGAAAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGGGACACAGAGAAAAGGAAAAGGAGGGAGGAGGCAG*AGAGAACCAGAACGTGAAGGCGGGGAGGGAGAAG

WB0777 M AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACAAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG

WB0777 P AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATAACGAAGCG^ACGCACGAAGGGAGAAAAGAGAAAAGGGGAAAGGAAGAAGCAGGAAAG*GGGGCAAAAGAAAATAAAGGCGGGGAGGGGAGAAG

WB0783 M AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACAAAGAGAAAAGGGGAGAGGAAGGGAACGGAAG*GGGGCAAAAGCAAATAAAGGCAGGAGGGGAAGGAA

WB0783 P AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACAAAGAGAAAAGGGGAGAGGAAGGGAACGGAAG*GGGGCAAAAGCAAATAAAGGCAGGAGGGGAAGGAA

WB0800 M AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG

WB0800 P AAAGAAGGAAGGACCGGAAAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGGGACACAGAGAAAAGGAAAAGGAGGGAGGAGGCAG*AGAGAACCAGAACGTGAAGGCGGGGAGGGAGAAG

WB0803 M CGAGAAGGAAGGACCGGAAAAGCATGCAGGAGAG^GAACAAAGGAAGAGAGACGGATGGCAGGGAGAGGCAGAAGGCAGCGA*AGAGAACCAGAACGTGAAGGCGGGGAGGGAGAAG

WB0803 P AAGACAGGAAGGAACAAAAGAACATACAGAAGCA^GAACAAAGGAAGAACAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG

WST047 M AAAGAAGGAAGGAACAAACAAGAGAGCAGGAGAG^ACACACGAAGGAGACAAAGAGAAAGGGGAAAGGAAGAAGGCAGCGA*GGGGCAAAAGAAAGTGAAGGCAGGGAGGGGAGAAG

WST047 P AAAGAAGGGAGGAACAAACAACCAACCGGAGCA^GAGAGCGAGAGGAACAACGAGAAAAGGGAAAAGGAAGAAGGCAGGAG*AGGGAGAAAGAGAATAAAGGGGGGAGGGGAGAAG

Anhang 5: Auswertung von Sequenzdaten aus dem 1000 Bull Genomes Project

Vergleich der Genotypen von 1147 Tieren verschiedenster Rassen aus dem *1000 Bull Genomes Project* (DAETWYLER et al., 2014) für die von MCCLURE et al. (2013) ermittelten 41 Kandidaten-SNPs. Für jeden SNP (REF: Referenzallel, ALT: alternatives Allel) wird die Frequenz des alternativen Allels in der Stichprobe der jeweiligen Rasse (Anzahl der Tiere in Klammern hinter der Rassebezeichnung) sowie die genaue Verteilung der Genotypen (homozygot für Referenzallel | heterozygot | homozygot für alternatives Allel) angegeben. SNPs mit grünem Hintergrund liegen innerhalb des in Kapitel 4.4 identifizierten Homozygotiesegments (48 688 283 bp – 50 412 884 bp), rote Schriftfarbe weist auf zwei mit dem Auftreten des Weaver-Syndroms assoziierte SNPs hin. (Quelle: Dr. Hubert Pausch, TU München)

a) HOL: Holstein, FV: Fleckvieh, ANG: Angus, SIM: Simmental, JER: Jersey, BS: Brown Swiss

| Nummer | Position | REF | ALT | HOL (288) | FV (142) | ANG (121) | SIM (77) | JER (61) | BS (59) |
|--------|----------|-----|-----|------------------|-------------------|-------------|------------------|------------|-----------------|
| 1 | 49651768 | A | G | 0 (288 0 0) | 0.0775 (120 22 0) | 0 (121 0 0) | 0.1104 (60 17 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 2 | 49656945 | C | T | 0 (288 0 0) | 0.0775 (120 22 0) | 0 (121 0 0) | 0.1104 (60 17 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 3 | 49657798 | G | A | 0 (288 0 0) | 0.0775 (120 22 0) | 0 (121 0 0) | 0.1104 (60 17 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 4 | 49664852 | C | T | 0 (288 0 0) | 0.0775 (120 22 0) | 0 (121 0 0) | 0.1104 (60 17 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 5 | 49667361 | C | T | 0 (288 0 0) | 0.0775 (120 22 0) | 0 (121 0 0) | 0.1104 (60 17 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 6 | 49673503 | C | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 7 | 49681169 | T | C | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 8 | 49682552 | A | G | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 9 | 49686038 | A | G | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 10 | 49687224 | T | G | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 11 | 49687585 | C | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 12 | 49691015 | G | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.0845 (118 24 0) | 0 (121 0 0) | 0.1494 (54 23 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 13 | 49692015 | T | C | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 14 | 49692485 | G | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |

| Nummer | Position | REF | ALT | HOL (288) | FV (142) | ANG (121) | SIM (77) | JER (61) | BS (59) |
|--------|----------|-----|-----|--|-------------------|-------------|------------------|------------|-----------------|
| 15 | 49692825 | C | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 16 | 49693121 | T | C | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 17 | 49693140 | G | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 18 | 49693164 | A | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 19 | 49693178 | A | C | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 20 | 49693265 | A | G | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 21 | 49693284 | G | A | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 22 | 49693601 | T | C | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 23 | 49693913 | A | C | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1494 (54 23 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 24 | 49694977 | A | G | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 25 | 49695504 | G | A | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 26 | 49695952 | C | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 27 | 49698002 | C | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.0845 (118 24 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 28 | 49698436 | C | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 29 | 49700154 | G | A | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 30 | 49701106 | T | C | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 31 | 49702287 | T | C | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 32 | 49702494 | G | A | im Datensatz des 1000 Bull Genomes Project nicht vorhanden | | | | | |
| 33 | 49705951 | A | G | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 34 | 49706022 | T | C | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 35 | 49708283 | T | C | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 36 | 49715678 | C | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 37 | 49718641 | C | T | 0.0017 (287 1 0) | 0.088 (117 25 0) | 0 (121 0 0) | 0.1558 (53 24 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |

| Nummer | Position | REF | ALT | HOL (288) | FV (142) | ANG (121) | SIM (77) | JER (61) | BS (59) |
|--------|----------|-----|-----|-------------|-------------------|-------------|------------------|------------|-----------------|
| 38 | 49878773 | C | T | 0 (288 0 0) | 0 (142 0 0) | 0 (121 0 0) | 0 (77 0 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 39 | 50481151 | A | G | 0 (288 0 0) | 0.0775 (120 22 0) | 0 (121 0 0) | 0.1169 (59 18 0) | 0 (61 0 0) | 0.0254 (56 3 0) |
| 40 | 50858538 | G | A | 0 (288 0 0) | 0 (142 0 0) | 0 (121 0 0) | 0 (77 0 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |
| 41 | 50929556 | A | G | 0 (288 0 0) | 0 (142 0 0) | 0 (121 0 0) | 0 (77 0 0) | 0 (61 0 0) | 0.0169 (57 2 0) |

b) GV: Gelbvieh, CHA: Charolais, LIM: Limousin, HER: Hereford, GCOM: Guelph Composite, BBO: Beef Booster

| Nummer | Position | REF | ALT | GV (34) | CHA (33) | LIM (32) | HER (31) | GCOM (30) | BBO (29) |
|--------|----------|-----|-----|-----------------|-----------------|-----------------|------------|------------|----------------|
| 1 | 49651768 | A | G | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0156 (31 1 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 2 | 49656945 | C | T | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0156 (31 1 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 3 | 49657798 | G | A | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0156 (31 1 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 4 | 49664852 | C | T | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0156 (31 1 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 5 | 49667361 | C | T | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0156 (31 1 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 6 | 49673503 | C | T | 0.0147 (33 1 0) | 0 (33 0 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 7 | 49681169 | T | C | 0.0147 (33 1 0) | 0 (33 0 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 8 | 49682552 | A | G | 0.0147 (33 1 0) | 0 (33 0 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 9 | 49686038 | A | G | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 10 | 49687224 | T | G | 0.0147 (33 1 0) | 0 (33 0 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 11 | 49687585 | C | T | 0.0147 (33 1 0) | 0 (33 0 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 12 | 49691015 | G | T | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 13 | 49692015 | T | C | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |

| Nummer | Position | REF | ALT | GV (34) | CHA (33) | LIM (32) | HER (31) | GCOM (30) | BBO (29) |
|--------|----------|-----|-----|--|-----------------|-----------------|------------|------------|-----------------|
| 14 | 49692485 | G | T | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 15 | 49692825 | C | T | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 16 | 49693121 | T | C | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 17 | 49693140 | G | T | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 18 | 49693164 | A | T | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 19 | 49693178 | A | C | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 20 | 49693265 | A | G | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 21 | 49693284 | G | A | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 22 | 49693601 | T | C | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 23 | 49693913 | A | C | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0625 (28 4 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 24 | 49694977 | A | G | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 25 | 49695504 | G | A | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 26 | 49695952 | C | T | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 27 | 49698002 | C | T | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0312 (30 2 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 28 | 49698436 | C | T | 0.0147 (33 1 0) | 0 (33 0 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 29 | 49700154 | G | A | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 30 | 49701106 | T | C | 0.0147 (33 1 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 31 | 49702287 | T | C | 0.0294 (32 2 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.0862 (24 5 0) |
| 32 | 49702494 | G | A | im Datensatz des 1000 Bull Genomes Project nicht vorhanden | | | | | |
| 33 | 49705951 | A | G | 0.0294 (32 2 0) | 0.0303 (31 2 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.0862 (24 5 0) |
| 34 | 49706022 | T | C | 0.0294 (32 2 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.0862 (24 5 0) |
| 35 | 49708283 | T | C | 0.0294 (32 2 0) | 0 (33 0 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.0862 (24 5 0) |
| 36 | 49715678 | C | T | 0.0294 (32 2 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.0862 (24 5 0) |

| Nummer | Position | REF | ALT | GV (34) | CHA (33) | LIM (32) | HER (31) | GCOM (30) | BBO (29) |
|--------|----------|-----|-----|-----------------|-----------------|-----------------|------------|------------|-----------------|
| 37 | 49718641 | C | T | 0.0294 (32 2 0) | 0.0152 (32 1 0) | 0.0469 (29 3 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.0862 (24 5 0) |
| 38 | 49878773 | C | T | 0 (34 0 0) | 0 (33 0 0) | 0 (32 0 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0 (29 0 0) |
| 39 | 50481151 | A | G | 0.0294 (32 2 0) | 0 (33 0 0) | 0 (32 0 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.069 (25 4 0) |
| 40 | 50858538 | G | A | 0 (34 0 0) | 0 (33 0 0) | 0 (32 0 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0 (29 0 0) |
| 41 | 50929556 | A | G | 0 (34 0 0) | 0 (33 0 0) | 0 (32 0 0) | 0 (31 0 0) | 0 (30 0 0) | 0.0172 (28 1 0) |

c) ACO: Alberta Composite, MON: Montbéliarde, AYR: Ayrshire, NOR: Normande, RED: Rotes Holstein-Rind, ANG_R: Red Angus, RDC: Red Dairy Cattle

| Nummer | Position | REF | ALT | ACO (28) | MON (28) | AYR (25) | NOR (24) | RED (23) | ANG_R (17) | RDC (16) |
|--------|----------|-----|-----|------------|-----------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|
| 1 | 49651768 | A | G | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0 (23 0 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 2 | 49656945 | C | T | 0 (28 0 0) | 0.0357 (27 0 1) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0 (23 0 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 3 | 49657798 | G | A | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0 (23 0 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 4 | 49664852 | C | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0 (23 0 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 5 | 49667361 | C | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0 (23 0 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 6 | 49673503 | C | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 7 | 49681169 | T | C | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 8 | 49682552 | A | G | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 9 | 49686038 | A | G | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 10 | 49687224 | T | G | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 11 | 49687585 | C | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 12 | 49691015 | G | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |

| Nummer | Position | REF | ALT | ACO (28) | MON (28) | AYR (25) | NOR (24) | RED (23) | ANG_R (17) | RDC (16) |
|--------|----------|-----|-----|--|-----------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|
| 13 | 49692015 | T | C | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 14 | 49692485 | G | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 15 | 49692825 | C | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 16 | 49693121 | T | C | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 17 | 49693140 | G | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 18 | 49693164 | A | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 19 | 49693178 | A | C | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 20 | 49693265 | A | G | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 21 | 49693284 | G | A | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 22 | 49693601 | T | C | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 23 | 49693913 | A | C | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 24 | 49694977 | A | G | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 25 | 49695504 | G | A | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 26 | 49695952 | C | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 27 | 49698002 | C | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 28 | 49698436 | C | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 29 | 49700154 | G | A | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 30 | 49701106 | T | C | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 31 | 49702287 | T | C | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 32 | 49702494 | G | A | im Datensatz des 1000 Bull Genomes Project nicht vorhanden | | | | | | |
| 33 | 49705951 | A | G | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 34 | 49706022 | T | C | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 35 | 49708283 | T | C | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |

| Nummer | Position | REF | ALT | ACO (28) | MON (28) | AYR (25) | NOR (24) | RED (23) | ANG_R (17) | RDC (16) |
|--------|----------|-----|-----|------------|-----------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|
| 36 | 49715678 | C | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 37 | 49718641 | C | T | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 38 | 49878773 | C | T | 0 (28 0 0) | 0 (28 0 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0 (23 0 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 39 | 50481151 | A | G | 0 (28 0 0) | 0.0179 (27 1 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0.0217 (22 1 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 40 | 50858538 | G | A | 0 (28 0 0) | 0 (28 0 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0 (23 0 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |
| 41 | 50929556 | A | G | 0 (28 0 0) | 0 (28 0 0) | 0 (25 0 0) | 0 (24 0 0) | 0 (23 0 0) | 0 (17 0 0) | 0 (16 0 0) |

d) DANR: Dänisches Rotvieh, BBL: Weißblaue Belgier, COM: Composite, PIE: Piedmonteser, ERI: Eringer, GAL: Galloway, High: Schottisches Hochlandrind, ROM: Romagnola

| Nummer | Position | REF | ALT | DANR (15) | BBL (10) | COM (9) | PIE (5) | ERI (2) | GAL (2) | High (2) | ROM (1) |
|--------|----------|-----|-----|-----------------|------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 49651768 | A | G | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0 (9 0 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 2 | 49656945 | C | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0 (9 0 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 3 | 49657798 | G | A | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0 (9 0 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 4 | 49664852 | C | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0 (9 0 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 5 | 49667361 | C | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0 (9 0 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 6 | 49673503 | C | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 7 | 49681169 | T | C | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 8 | 49682552 | A | G | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 9 | 49686038 | A | G | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 10 | 49687224 | T | G | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |

| Nummer | Position | REF | ALT | DANR (15) | BBL (10) | COM (9) | PIE (5) | ERI (2) | GAL (2) | High (2) | ROM (1) |
|--------|----------|-----|-----|--|------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 11 | 49687585 | C | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 12 | 49691015 | G | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 13 | 49692015 | T | C | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 14 | 49692485 | G | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 15 | 49692825 | C | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 16 | 49693121 | T | C | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 17 | 49693140 | G | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 18 | 49693164 | A | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 19 | 49693178 | A | C | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 20 | 49693265 | A | G | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 21 | 49693284 | G | A | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 22 | 49693601 | T | C | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 23 | 49693913 | A | C | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 24 | 49694977 | A | G | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 25 | 49695504 | G | A | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 26 | 49695952 | C | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 27 | 49698002 | C | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 28 | 49698436 | C | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 29 | 49700154 | G | A | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 30 | 49701106 | T | C | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 31 | 49702287 | T | C | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 32 | 49702494 | G | A | im Datensatz des 1000 Bull Genomes Project nicht vorhanden | | | | | | | |
| 33 | 49705951 | A | G | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |

| Nummer | Position | REF | ALT | DANR (15) | BBL (10) | COM (9) | PIE (5) | ERI (2) | GAL (2) | High (2) | ROM (1) |
|--------|----------|-----|-----|-----------------|------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 34 | 49706022 | T | C | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 35 | 49708283 | T | C | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 36 | 49715678 | C | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 37 | 49718641 | C | T | 0.2333 (10 3 2) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 38 | 49878773 | C | T | 0 (15 0 0) | 0 (10 0 0) | 0 (9 0 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 39 | 50481151 | A | G | 0 (15 0 0) | 0 (10 0 0) | 0.0556 (8 1 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 40 | 50858538 | G | A | 0 (15 0 0) | 0 (10 0 0) | 0 (9 0 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 41 | 50929556 | A | G | 0 (15 0 0) | 0 (10 0 0) | 0 (9 0 0) | 0 (5 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (2 0 0) | 0 (1 0 0) |

e) SAL: Salers-Rind, TYR: Tiroler Grauvieh, unkn: Unbekannt

| Nummer | Position | REF | ALT | SAL (1) | TYR (1) | unkn (1) |
|--------|----------|-----|-----|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 49651768 | A | G | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 2 | 49656945 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 3 | 49657798 | G | A | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 4 | 49664852 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 5 | 49667361 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 6 | 49673503 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 7 | 49681169 | T | C | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 8 | 49682552 | A | G | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 9 | 49686038 | A | G | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |

| Nummer | Position | REF | ALT | SAL (1) | TYR (1) | unkn (1) |
|--------|----------|-----|-----|---|-----------|-----------|
| 10 | 49687224 | T | G | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 11 | 49687585 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 12 | 49691015 | G | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 13 | 49692015 | T | C | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 14 | 49692485 | G | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 15 | 49692825 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 16 | 49693121 | T | C | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 17 | 49693140 | G | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 18 | 49693164 | A | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 19 | 49693178 | A | C | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 20 | 49693265 | A | G | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 21 | 49693284 | G | A | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 22 | 49693601 | T | C | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 23 | 49693913 | A | C | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 24 | 49694977 | A | G | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 25 | 49695504 | G | A | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 26 | 49695952 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 27 | 49698002 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 28 | 49698436 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 29 | 49700154 | G | A | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 30 | 49701106 | T | C | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 31 | 49702287 | T | C | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 32 | 49702494 | G | A | im Datensatz des <i>1000 Bull Genomes Project</i> nicht vorhanden | | |

| Nummer | Position | REF | ALT | SAL (1) | TYR (1) | unkn (1) |
|--------|----------|-----|-----|-----------|-----------|-----------|
| 33 | 49705951 | A | G | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 34 | 49706022 | T | C | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 35 | 49708283 | T | C | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 36 | 49715678 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 37 | 49718641 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 38 | 49878773 | C | T | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 39 | 50481151 | A | G | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 40 | 50858538 | G | A | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |
| 41 | 50929556 | A | G | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) | 0 (1 0 0) |

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich der Tierzuchtforschung e.V. München und besonders Herrn Dr. Ingolf Ruß danken, die mich für die Durchführung dieser Arbeit angestellt und das Forschungsvorhaben finanziert haben. Vielen Dank auch für die Möglichkeit des Besuchs von Weiterbildungs- und Tagungsveranstaltungen.

Bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Ivica Međugorac möchte ich mich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und der zugehörigen Veröffentlichung, die vielen guten Ratschläge und die unterhaltsamen Anekdoten bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Mitbetreuerin und Bürogenossin Dr. Sophie Rothammer für ihre Hilfe und Unterstützung bei allen Fragen meinerseits, die kritische Durchsicht der Manuskripte, die netten Gespräche und ihre Begeisterungsfähigkeit für kreative Aktivitäten außerhalb der Arbeit.

Des Weiteren danke ich den Projektpartnern inner- und außerhalb der Tierärztlichen Fakultät (Prof. Dr. Kaspar Matiasek, Prof. Dr. Ruedi Fries, Dr. Hubert Pausch, Dr. Hermann Schwarzenbacher und Dr. Franz Seefried) für die gute Zusammenarbeit, die Bereitstellung von Daten- und Probenmaterial sowie die Unterstützung bei den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen und der Anfertigung der Veröffentlichung. Dr. Doris Seichter danke ich zudem für die schnelle, unkomplizierte Hilfe bei der Organisation und Genotypisierung der Proben.

Ein von Herzen kommendes Dankeschön auch an meine Mitdoktoranden Dr. Marc-Philipp Müller, Kristin Heidrich, Fanny Bitzer und Victoria Göckmann, ohne die die Zeit hier nur halb so schön gewesen wäre. Danke für alles, was ich in und außerhalb der Arbeit mit euch erleben durfte!

Vielen lieben Dank auch an das restliche Team (Renate Damian, Martin Dinkel, Karina Schadt, Foteini Kyriakou, Sissi Stern und unsere beiden

Gastwissenschaftlerinnen Jelena Ramljak und Mojca Simčič) für eure offene, herzliche Art, das gute Arbeitsklima und die unterhaltsame Zeit in eurer Mitte.

Ein riesiges Dankeschön gilt auch meinem Freund Anselm Hannemann für sein Verständnis, seine unendliche Geduld und seine Unterstützung durch das gesamte Studium und die Zeit der Doktorarbeit hindurch. Schön dass es dich gibt!

Außerdem möchte ich mich natürlich bei meinen Freunden bedanken, die zwar in alle Himmelsrichtungen verstreut sind, auf die ich aber trotzdem in allen Lebenslagen zählen kann.

Und zu guter Letzt – DANKE an meine Familie und besonders meine Eltern, die immer an mich geglaubt und mich darin bestärkt haben, meinen Weg zu gehen! Euer Zuspruch, euer Interesse und eure uneingeschränkte Unterstützung haben mich durch alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre begleitet und waren mein größter Rückhalt.